

FACULTÉ MIXTE
DE
MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE
DE MARSEILLE

N° 7

RECHERCHES
SUR
LE MÉCANISME DU RACHITISME
EXPÉRIMENTAL

THÈSE

PRÉSENTÉE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE
DEVANT LA FACULTÉ DE MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE
ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Le Janvier 1941

PAR

Marie-Thérèse SIMONOT

née le 14 Juin 1913, à Châlon-sur-Saône

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Examineurs
de la Thèse } MM. ROCHE, Professeur, *Président*,
GIRAUD, Professeur,
MALMÉJAC, Professeur,
DUBOULOZ, *Agrégé*.

} *Assesseurs.*

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE MAURICE DECLUME

1940

FACULTÉ MIXTE
DE
MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE
DE MARSEILLE N°

RECHERCHES
SUR
LE MÉCANISME DU RACHITISME
EXPÉRIMENTAL

THÈSE

PRÉSENTÉE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE
DEVANT LA FACULTÉ DE MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE
ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Le Janvier 1941

PAR

Marie-Thérèse SIMONOT

née le 14 Juin 1913, à Châlon-sur-Saône

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Examineurs de la Thèse	{	MM. ROCHE, Professeur, <i>Président</i> ,	{	Assesseurs.
		GIRAUD, Professeur,		
		MALMÉJAC, Professeur,		
		DUBOULOZ, Agrégé.		

LONS-LE-SAUNIER
IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE MAURICE DECLUME

1940

PERSONNEL DE LA FACULTÉ MIXTE

DE

MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Doyen : Lucien CORNIL

Assesseur : A. CHEVALLIER

Doyen honoraire : L. IMBERT

Professeurs honoraires : MOITESSIER, CASSOUTE

Chargés de Cours honoraires : TIAN, BRUN.

Secrétaire : J. COMTE

Bibliothécaire : M^{lle} GEORGE

Professeurs :

Anatomie.....	CORSY
Anatomie pathologique et Pathologie expérimentale.....	CORNIL
Bactériologie	ROUSLACROIX
Chimie analytique et hydrologie	RIMATTEI
Chimie médicale.....	ROCHE
Clinique chirurgicale	FIOLLE
Clinique chirurgicale	BOURDE
Clinique exotique	HECKENROTH
Clinique des maladies nerveuses	ROGER
Clinique médicale.....	AUDIBERT
Clinique médicale.....	OLMER
Clinique médicale	MATTEI
Clinique médicale infantile	GIRAUD
Clinique obstétricale	VAYSSIÈRE
Clinique ophtalmologique	AUBARET
Clinique Oto-Rhino-Laryngologique.....	BREMOND
Clinique urologique.....	CHAUVIN
Histoire naturelle.....	GABRIEL
Histologie.....	ROMIEU
Hygiène générale et coloniale	VIOLE
Médecine légale	MOSINGER
Parasitologie	JOYEUX
Pathologie interne	NONGES
Pharmacodynamie et matière médicale	MERCIER
Pharmacie.....	VIGNOLI
Physiologie	COTTE
Physique.....	CHEVALLIER
Thérapeutique	GAUJOUX
Stomatologie (Professeur sans chaire)	BELTRAMI
Physiologie (Professeur sans chaire)	MALMÉJAC



Chargé de cours :

Clinique dermatologique VIGNE

Agrégés en exercice :

MM. PIÉRI	MM. SAUTET	MM. ARNOUX
JAYLE	BALANSARD	DELPHAUT
MOIROUD	BRAHIC	IMBERT
CARCASSONNE	FIGARELLA	AUDIER
BERTHIER	SALMON	CHOSSON
POINSO	PAILLAS	DOR
DUBOULOZ		RECORDIER

Agrégé libre :

M. QUINTARET

Chargé des fonctions d'agrégé :

Chimie médicale..... DERRIEN

Chargés de Cours complémentaires :

Anatomie descriptive et topographique	SALMON
Médecine du travail.....	PERIOT
Psychiatrie.....	ALLIEZ
Toxicologie	GUILLOT
Chimie biologique	DUMAZERT



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A MES PARENTS

*Ma reconnaissance et mon
affection.*

A MON FIANCÉ ROGER VALLÉE

CROIX DE GUERRE 1940

A MON MAÎTRE

MONSIEUR LE PROFESSEUR J. ROCHE

*Ma respectueuse et affectueuse
reconnaissance.*

A MON JURY DE THÈSE

Très respectueusement.

A MES AMIS ET A MES CAMARADES
DU LABORATOIRE DE CHIMIE BIOLOGIQUE

TABLE DES MATIÈRES.

Pages

INTRODUCTION.

Rachitisme humain et rachitisme expérimental.....	13
I. LE RACHITISME HUMAIN.....	14
A. Lésions osseuses	14
B. Formes cliniques	15
Rachitisme floride ou eutrophique.....	15
Rachitisme hypotrophique	16
Rachitisme dystrophique	16
C. Origines du rachitisme humain.....	17
II. LE RACHITISME EXPÉRIMENTAL	18
Facteurs alimentaires du rachitisme que l'expérimentation a permis de dissocier	19
A. Nature et équilibre des sels ingérés.....	19
B. Vitamine D	21
III. ÉTUDE COMPARÉE DU RACHITISME HUMAIN ET DU RACHITIS- ME EXPÉRIMENTAL	25
A. Le rachitisme humain et le rachitisme expérimental sont-ils identiques ?	25
B. Faits d'ordre thérapeutique	26
Alimentation en sels	26
Vitamine D	27
IV. ETAT ACTUEL DE NOS CONNAISSANCES SUR L'ORIGINE DU RA- CHITISME	29
A. Formation de la substance osseuse	29
1. Mécanisme histologique général	29
2. Composition de la substance osseuse.....	30
3. Apport des matériaux calcaires.....	31
Phénomènes histologiques	31
Aspect biochimique du problème	31
4. Fixation des sels de l'os à leur support organi- que	33

B. Origines du rachitisme	34
1. Origine intestinale	34
Ravitaillement en sels	34
Vitamine D	36
2. Origine osseuse	37
V. OBJET DU TRAVAIL.....	37

RECHERCHES PERSONNELLES.

PREMIÈRE PARTIE.

La phosphatase des os dans le rachitisme expérimental.....	39
I. GÉNÉRALITÉS SUR LA PHOSPHATASE DES OS.....	39
Préparation	39
Propriétés	39
Rôle physiologique	40
II. PHOSPHATASE DES OS ET RACHITISME.....	42
III. PLAN DES RECHERCHES.....	43
IV. MARCHE DES EXPÉRIENCES ET TECHNIQUES.....	44
Dosage de l'activité phosphatasique des os.....	45
V. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX	46
VI. DISCUSSION DES RÉSULTATS	55
Activité phosphatasique au cours du rachitisme expérimental	59
Activité phosphatasique en présence d'ions Mg^{++} dans les os rachitiques	60
VII. CONCLUSIONS	62

SECONDE PARTIE.

Affinité de la matrice préosseuse pour les ions phosphorique et calcium dans le rachitisme expérimental	63
I. CACIFICATION <i>in vitro</i>	64
II. MARCHE DES EXPÉRIENCES	69
A. Dosage du calcium dans les milieux nutritifs..	70
B. Fixation <i>in vitro</i> des ions $PO_4^=$ et Ca^{++} sur des fragments osseux	72
Préparation de la solution nutritive.....	72
Marche des expériences et résultats.....	72
C. Discussion des résultats et conclusions.....	81

Fixation de $\text{PO}_4^=$ et Ca^{++} par le cartilage de conjugaison et la métaphyse des fémurs de Veau	81
Fixation de $\text{PO}_4^=$ et Ca^{++} par le cartilage de conjugaison des os de jeunes Rats normaux	82
Fixation de $\text{PO}_4^=$ et Ca^{++} par le cartilage de conjugaison des os de jeunes Rats rachitiques	82
Discussion générale des résultats et conclusions.....	85
Résumé	89
BIBLIOGRAPHIE	91

INTRODUCTION.

Rachitisme humain et rachitisme expérimental.

Le rachitisme est une maladie qui paraît être répandue dans le monde depuis des temps très anciens. De nombreux chercheurs lui ont consacré leur travaux. Dès l'époque gréco-romaine, SORANUS D'EPHÈSE en donna une description satisfaisante. Puis on ne trouve plus de document à ce sujet jusqu'au XVI^e siècle. C'est alors que l'on atteint la « période anglaise » ou « période de GLISSON » de l'histoire du rachitisme, caractérisée par la publication en 1650, par GLISSON, du traité en latin « De rachitide » dans lequel sont décrits les signes de cette maladie. En outre GLISSON observe un autre trouble de la nutrition de l'enfant : le scorbut infantile.

Le XVIII^e siècle n'apporte aucune recherche importante. Au début du XIX^e siècle, WENDELSTADT, TROUSSEAU et LASEGUE établissent une relation entre le rachitisme et l'ostéomalacie. Plus tard c'est en appliquant la chimie aux problèmes pathologiques que l'on poursuit l'étude de cette maladie. Il est à signaler qu'en 1885 POMMER fait d'intéressantes constatations histologiques et notamment l'excès de tissu ostéoïde qui se forme dans les épiphyses des os chez les rachitiques.

Au XX^e siècle apparaît une méthode d'étude nouvelle : le « rachitisme expérimental », provoqué dans les laboratoires. On fait entrer en jeu les vitamines, les facteurs spécifiques de la nutrition osseuse, les rayons ultra-violets, l'examen chimique du sang et la radiographie. Aussi la mise en œuvre de tels moyens permet-elle à HESS [35] de dire : « Notre connaissance du rachitisme promet d'être plus grande dans la première moitié de ce siècle que durant les deux cent cinquante années précédentes ».

I. — Le rachitisme humain.

Comme le montre ce bref historique les pédiatres se sont pendant longtemps bornés à décrire les dystrophies osseuses propres au rachitisme infantile. Quelles sont ces déformations caractéristiques, ces lésions osseuses dont VIRCHOW a décrit le tableau classique au XIX^e siècle ?

A. — LÉSIONS OSSEUSES.

De nos jours le rachitisme atteint rarement un caractère très grave, grâce à un traitement précoce. Suivant les cas, les signes morbides sont plus ou moins accentués. Généralement les dystrophies osseuses se décèlent de la manière suivante : Les fontanelles du crâne sont élargies et les os crâniens anormalement minces, la déformation des os frontaux provoque un élargissement du haut du visage (« crâne olympien ») et celle des maxillaires donne « le menton en galoche ».

Le thorax est presque toujours rétréci, quelquefois même au point de gêner la respiration. L'élargissement des articulations costo-chondrales donne ce qu'on appelle : « le chapelet costal ». L'abdomen est proéminent (en besace). Dans les cas graves le rachis est atteint et l'on peut voir de la scoliose ou de la cyphose. Le bassin déformé prend une forme typique « en trèfle » ; le ramolissement des os pelviens oblige la tête du fémur à pousser la cavité cotyloïde à l'intérieur de la cavité pelvienne. Quant aux membres, on note de l'intumescence des poignets, et une certaine courbure des avant-bras. Les membres inférieurs se courbent sous le poids du corps et des fractures apparaissent quelquefois. Les genoux s'entrechoquent et la mobilité des articulations est anormale, les chevilles sont enflées. Le squelette entier peut subir un défaut général de croissance aboutissant au « nanisme rachitique ». A ces dystrophies osseuses s'ajoutent un retard dans la dentition, dans l'aptitude à la marche de l'enfant. De plus la musculature est déficiente.

L'altération caractéristique des os consiste en leur mollesse, en relation avec l'augmentation de leur teneur en eau et leur pauvreté en cendres. A l'examen l'os présente une teinte rosée, due à l'hypérémie qui affecte le périoste. Celui-ci est fréquemment épaissi et il recouvre une couche rougeâtre ou blanchâtre d'aspect cartilagineux. Les rayons X ont été appliqués

à l'étude du rachitisme pour la première fois par KOELHER en 1901, puis plus tard par de nombreux auteurs, MELLANBY [56], HULDCHINSKY [40], PARK [105], HOWLAND [39]. Ils donnent de précieux renseignements. On décèle radiographiquement un élargissement des épiphyses inférieures du radius, du cubitus et du tibia chez les rachitiques. L'extrémité de la métaphyse est « en cupule » ; ses bords sont légèrement frangés et la ligne d'ossification s'estompe. La partie spongieuse de l'os a une trame plus épaisse due au développement de tissu ostéoïde. La diaphyse se décalcifie et présente une ostéoporose diffuse. L'élargissement apparent du périoste est dû à la néoformation de tissu ostéoïde.

POMMER, SCHMORL, BOUCAUMONT [10] ont beaucoup contribué à l'étude histologique du rachitisme et l'on peut examiner, les lésions osseuses à ce point de vue. Histologiquement : c'est dans la région diaépiphysaire que l'on trouve des altérations typiques dues au rachitisme. Normalement les différentes couches de cellules de cette région ont une disposition bien définie. Dans le rachitisme il se produit au niveau du cartilage de conjugaison des proliférations cellulaires anarchiques. Au lieu de cellules bien alignées, nettement délimitées, on trouve des cellules plus grandes, en couches irrégulières et multiples qui s'étendent dans la métaphyse, ce qui donne au cartilage un aspect dentelé. « La substance ostéoïde est caractérisée par la formation dans le tissu chondroïde d'un os conjonctif ou fibreux assez analogue à un tissu de cal ; cet os est toujours imparfait ». La substance chondroïde présente à l'examen histologique certains caractères qui font penser à un œdème du cartilage (BOUCAUMONT [10]). La zone de calcification préparatoire n'a presque pas de calcium, et la disposition typique, en colonnes, des cellules n'existe plus. La zone spongieuse n'a plus une trame aussi régulière, il se développe du tissu ostéoïde. On trouve aussi ce dernier le long du périchondre et du cortex ; il peut également empiéter sur la cavité médulaire. La moelle est très irriguée.

Après cette description générale des lésions osseuses, il faut envisager les différentes formes de rachitisme (EDEL [18]).

B. — FORMES CLINIQUES.

Rachitisme floride ou « eutrophique ». — Les enfants malades sont florissants, grands et gros. Ce sont des suralimentés. La nutrition générale est bonne, on remarque cependant une

certaine pâleur, de la mollesse des téguments, et des déformations osseuses surtout marquées aux membres inférieurs ; la radiographie montre des lésions diaépiphysaires.

C'est là une « forme affirmée » du rachitisme ; il en existe également une « forme fruste », que l'on peut déceler dès les premiers mois de la vie d'un nourrisson ; si l'enfant est susceptible de présenter du rachitisme, il élimine trop de calcium par les selles et trop de phosphore par les urines (MOURQUAND [60], LEULIER [60]), fait qui se rencontre surtout chez les nourrissons élevés au biberon.

Rachitisme « hypotrophique ». — Il est beaucoup plus fréquent que le précédent. Les enfants sont maigres, leur croissance est ralentie ; ils perdent même du poids. On observe des dystrophies osseuses ; l'intumescence des épiphyses est plus marquée que dans le rachitisme floride. La radiographie montre des lésions dans la diaphyse et dans les épiphyses. Ces enfants ont eu souvent des maladies infectieuses qui ont influé sur l'état général. Une « forme fruste » existe également.

Rachitisme « dystrophique ». — L'enfant qui en souffre a une croissance très retardée ; il est d'une maigreur accentuée, et ses déformations osseuses sont très prononcées. Les rayons X montrent des troubles de la calcification dans les épiphyses. Dans ce cas, le rachitisme est, en général, lié à des troubles graves de la nutrition.

De même dans le rachitisme rénal et la maladie coeliaque. *Le rachitisme rénal* atteint les enfants plus âgés que précédemment et une insuffisance relative des reins en est la cause. Les lésions osseuses sont analogues à celles du nouveau-né. Ces enfants, qui sont des nains, meurent souvent d'une crise d'urémie. *La maladie coeliaque* apparaît vers deux ou trois ans, après une première enfance normale. Le malade a des indigestions chroniques, des selles volumineuses et stéatorrhéiques ; il s'ensuit une perte de poids et de force et une fragilité osseuse manifeste.

Le rachitisme infantile peut avoir des complications directes telles que la spasmophilie ou tétanie infantile, état de surexcitation du système nerveux qui provoque des contractures, des crampes, et apparaît parfois dans la phase de guérison du rachitisme. « C'est une crise de guérison du rachitisme » (ROMINGER [93]).

Enfin, *le rachitisme tardif*, observé chez des enfants déjà grands, est une forme de transition vers le rachitisme des ado-

lescents ou « *ostéomalacie juvénile* ». Dans ce cas, les dystrophies osseuses observées dans le rachitisme infantile, sont très accentuées. L'état général est la plupart du temps très mauvais.

Il ressort de l'exposé précédent que le rachitisme humain est une affection caractérisée par des lésions osseuses. Ces dystrophies portent sur la calcification et sur l'organisation du tissu osseux chez les enfants soit dès les premières années de la vie, soit au moment de la puberté. On peut constater par l'étude chimique du sang, que dès le début de la maladie se manifeste une hypophosphatémie suivie d'une hypocalcémie, surtout dans les cas compliqués de tétanie. Les os des rachitiques sont caractérisés par l'augmentation de la teneur en eau, la diminution du pourcentage des cendres totales, du calcium et du phosphore ; celui du magnésium au contraire étant augmenté. Tels sont les faits observés, il convient de se demander quels en sont les facteurs étiologiques.

C. — ORIGINES DU RACHITISME HUMAIN.

Nous avons vu que les enfants élevés au biberon étaient plus sensibles au rachitisme que ceux élevés au sein et que fréquemment les « rachitiques florides » étaient des suralimentés. Dans les cas de « rachitisme tardif », les enfants n'ayant pas assez de lait complet, d'œufs, de beurre et de graisses animales, en sont affectés, comme on l'a observé en Allemagne pendant et après la guerre de 1914-1918. Il faut donc en premier lieu rechercher l'origine de cette affection dans un régime alimentaire défectueux.

Par ailleurs, les médecins connaissaient empiriquement, depuis très longtemps le pouvoir antirachitique de l'huile de foie de Morue. Plus récemment MELLANBY [56], PARK [105] et HOWLAND [39] ont donné des preuves probantes de son action thérapeutique et FUNK en conclusion de ses travaux assimilait le rachitisme à une « avitaminose » et déclarait que l'huile de foie de Morue est active parce qu'elle contient la vitamine qui manque à l'organisme rachitique (1913).

Les bienfaits de la lumière solaire ont aussi été constatés depuis très longtemps. Ce fut HULDCHINSKY [40] en 1919 qui le premier eut l'idée de remplacer la lumière solaire par les rayons ultra-violets produits par la lampe en quartz à vapeur de mercure ; il obtint ainsi la guérison des lésions osseuses. En réalité, la partie non saponifiable de l'huile de foie de Mo-

rue contient de l'ergostérol ou « provitamine » qui irradié donne naissance au facteur antirachitique (HESS [35], WINDAUS 1927). L'ergostérol ou une autre provitamine se trouverait également dans la peau et dans le sang ; irradié par les rayons ultra-violets, il devient antirachitique *in situ*. En plus de ces expériences qui ont conduit à la connaissance de la vitamine D₂, les expérimentateurs ont cherché quelles pouvaient être les répercussions sur l'organisme de la variation des teneurs en calcium et en phosphore du régime.

C'est pour approfondir toutes ces questions que des travaux ont été poursuivis dans les laboratoires sur le rachitisme expérimental.

II. — Le rachitisme expérimental.

L'évolution des travaux sur le rachitisme expérimental peut être divisée en trois périodes. La première est marquée par les recherches de Jules GUÉRIN qui, en 1839, essaya et prétendit réussir à rendre de jeunes Chiens sevrés rachitiques, en leur donnant un régime de viande, de pain et de pâtée. TRIPIER en 1874 ne put réaliser la production du rachitisme par cette même méthode. D'autres essais furent faits, notamment par VOIT, qui remarqua « l'importance du calcium dans l'organisme animal ».

POMMER en 1885 apporte ses constatations histologiques et ARON et SEBAUER leurs analyses chimiques des os en 1908. Avec MELLANBY en 1919 commence la seconde période, marquée non seulement par le fait que ce chercheur s'intéresse au rôle des vitamines, mais aussi par l'emploi de régimes bien définis et contrôlés.

La troisième période est celle où l'on a mis en évidence le rôle joué par l'insuffisance en phosphore du régime dans la production du rachitisme. C'est là le résultat des expériences de SCHABAD, SHERMANN [103], PAPPENHEIMER [103], MAC COL-LUM [105], SHIPLEY [105], PARK [105] faites sur le Rat blanc considéré depuis quelques années, comme l'animal de choix pour cette étude. STEENBOCK [40] et BLACK en 1925 ont suggéré l'emploi d'un régime pauvre en phosphore composé de maïs, de gluten de blé, de carbonate de calcium et de chlorure de sodium.

Les preuves histologiques du rachitisme expérimental sont : l'élargissement du cartilage de conjugaison qui est frangé du

côté de la diaphyse et n'est le siège d'aucun dépôt de calcium dans cette zone. Le fait caractéristique est le développement du tissu ostéoïde dans la métaphyse et le long des diaphyses. L'espace médullaire est étroit et les vaisseaux de la moelle congestionnés. Les différences sont à cet égard très minimes entre le rachitisme expérimental et le rachitisme humain ; elles sont sans doute dues à des différences dans la vitesse d'organisation des lésions. L'analyse chimique du sang montre qu'il y a hypophosphatémie (HOWLAND [39] et KRAMER [39]), alors que la calcémie est en général normale.

Nous pouvons déduire de ce qui précède que deux facteurs importants sont à considérer dans l'étiologie du rachitisme : l'apport salin du régime alimentaire et la vitamine D, dont l'étude a été très avancée durant ces dernières années.

Facteurs alimentaires du rachitisme que l'expérimentation a permis de dissocier.

A. — NATURE ET ÉQUILIBRE DES SELS INGÉRÉS.

Diverses expérimentations ont permis de préciser le rôle dans l'étiologie du rachitisme du calcium, du phosphore et du rapport : Ca/P du régime. L'importance du calcium et du phosphore avait été pressentie déjà par CHOSSAT [15] et KORENCHESKY [43] ; mais ce sont les travaux de MAC COLLUM qui éclaircissent la question.

L'organisme a besoin quotidiennement :

en calcium, de	{	0,025 g. par kilog chez le nourrisson
		0,008 g. par kilog chez l'adulte
en phosphore, de	{	0,050 g. par kilog chez le nourrisson
		0,013 g. par kilog chez l'adulte (HESS [35])

Donc la quantité de phosphore et la quantité de calcium indispensables ne sont pas négligeables ; mais ce qui importe plus encore c'est le rapport qu'elles présentent, soit : Ca/P. Pour que le développement du squelette soit optimum chez l'animal jeune et pour que le maintien de son intégrité soit assuré chez l'animal adulte, il faut réaliser un rapport : Ca/P voisin de 1,5. Des troubles de l'ossification apparaissent pour des régimes déséquilibrés quand : $\text{Ca/P} < 1$; ou $\text{Ca/P} > 3$; c'est ainsi que l'on provoque les lésions rachitiques. C'est sur ces données qu'est basé l'établissement du régime avec lequel PAPPENHEIMER [103] obtint le rachitisme expérimental du Rat.

Plus tard, d'autres régimes rachitigènes mieux équilibrés pour couvrir les besoins autres que ceux en calcium et en phosphore, ont été substitués à celui de PAPPENHEIMER. On emploie en général en France celui de RANDOIN et LECOQ [74]. Nous verrons par la suite la composition de ces différents régimes. On renforce notablement l'action rachitigène du régime RANDOIN et LECOQ en déséquilibrant ses sels par addition d'un excès de calcium et de phosphore. C'est ainsi que J. ROCHE et Y. MARCELET [92] ont préparé des régimes dont $\text{Ca/P} = 10$. Une telle alimentation provoque chez le jeune Rat un arrêt de croissance qu'il reçoive ou non de la vitamine D ; l'adulte subit alors un amaigrissement. Chez les animaux jeunes, les os cessent de croître mais ils se surminéralisent surtout en présence de vitamine D ; chez l'adulte on observe une tendance à la déminéralisation, qui peut être diminuée par l'adjonction de vitamine D. J. ROCHE et Y. MARCELET [92] ont également poursuivi des expériences sur les Rats en employant des régimes dont $\text{Ca/P} = 0,7$. Sans vitamine D cette alimentation est mal supportée ; les animaux adultes maigrissent et ceux en croissance perdent également du poids. Si on adjoint la vitamine D à ce régime on obtient une croissance peu rapide. L'action dystrophique des régimes rachitigènes est très rapide puisqu'elle se manifeste déjà histologiquement en deux à trois jours chez les Rats en période de croissance intense (25-30 g.).

Il est à envisager également un autre facteur d'équilibre, le rapport : acide/base. BROOKE [11], SMITH et SMITH [11], MAREK, WELLMANN et URBANYI [48] ont montré le lien qui existe entre ce rapport : acide/base, et Ca/P . Ainsi dans un régime où $\text{Ca/P} > 1$ on trouve un excès d'ions alcalins Ca^{++} ; ce métal peut être indifféremment remplacé par Sr^{++} ou Mg^{++} qui sont des alcalino-terreux (SCHABAD, A. ROCHE [80]). Dans un régime où Ca/P est < 1 , on a un excès de radicaux acides pouvant être dû soit aux glycérophosphates de sodium ou au phosphate monosodique, dont les valences acides libres provoquent un état d'acidose et il s'en suit une déminéralisation. Ce dont on est certain, c'est que les pH alcalins facilitent la calcification.

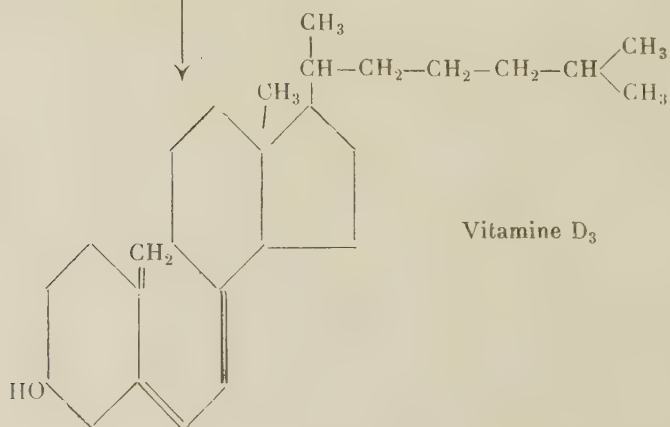
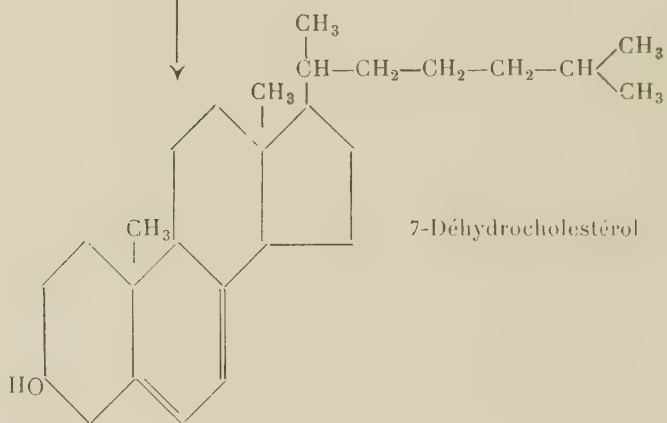
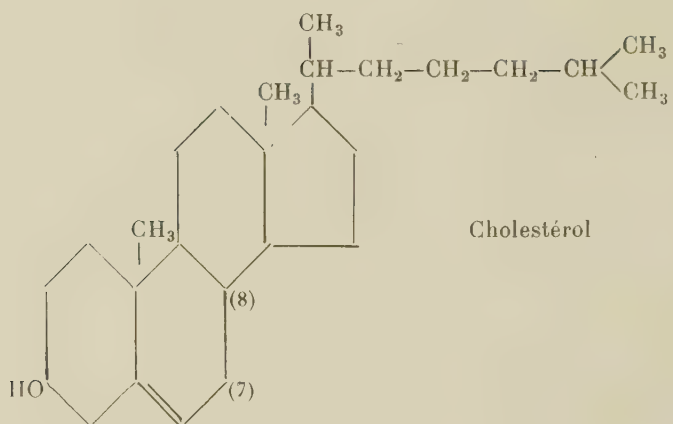
Certains auteurs ont étudié l'action des lipides sur le métabolisme du calcium dans l'organisme. Contrairement à ce que l'on croyait autrefois, l'expérience de KELLER prouve qu'un excès de lipides est nuisible à l'organisme. Des animaux re-

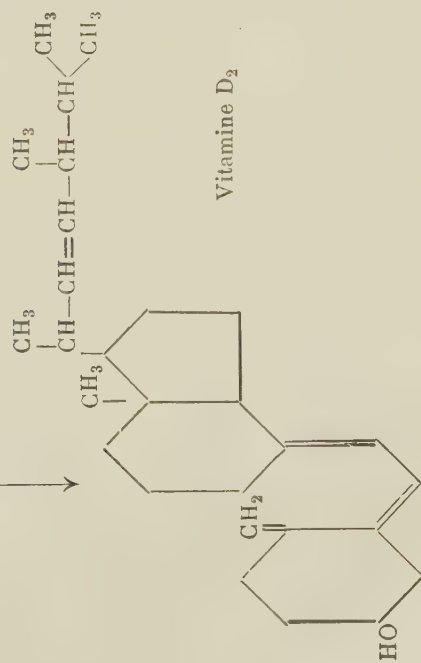
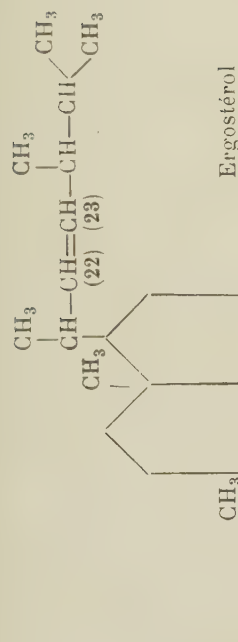
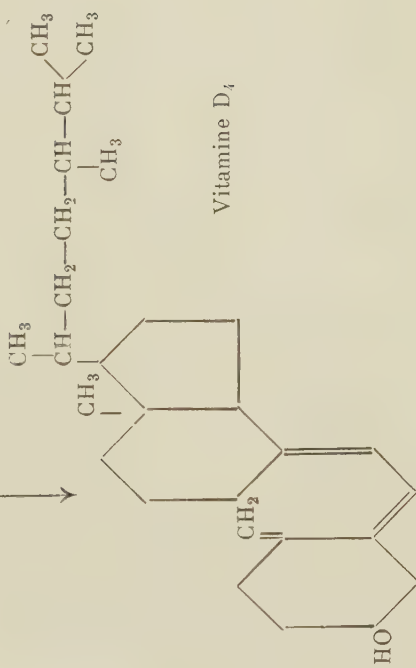
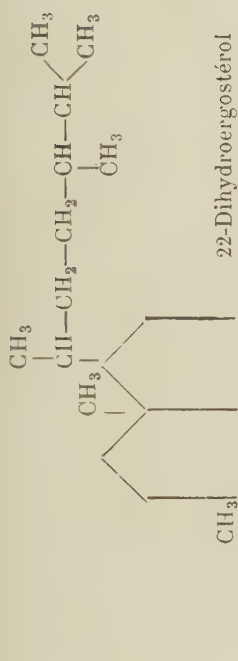
çoivent un régime déterminé au point de vue phosphore et calcium. Ces deux facteurs sont dosés dans les urines et dans les fèces. Puis on ajoute au régime un excès de lipides. L'analyse montre alors l'augmentation du phosphore urinaire, la diminution du phosphore et l'augmentation du calcium dans les fèces ; ce dernier est ainsi éliminé par le tube digestif à l'état de savon parce que les acides gras se combinent au calcium et donnent notamment de l'oléate de calcium. Le phosphore qui devait se combiner au calcium est alors éliminé par les urines.

En plus de ces facteurs alimentaires dont nous venons d'exposer l'action sur le système osseux, il convient d'envisager l'influence de la vitamine D et le rôle de sa carence dans l'étiologie du rachitisme.

B. — VITAMINE D.

En suivant l'évolution des recherches sur le rachitisme nous avons vu que MELLANBY [66] en 1919 s'intéressa particulièrement au rôle des vitamines. En 1921 il écrivait : « L'action des graisses dans le rachitisme est due à une vitamine, probablement identique à la vitamine liposoluble ». HESS [35], MACCANN [49] et PAPPENHEIMER [103] firent des expériences prouvant que la vitamine A n'était pas antirachitique, la carence de celle-ci provoquant seulement la xérophthalmie et, au point de vue du système osseux, de l'ostéoporose. Ce fut en 1922 que Mac COLLUM [105] et ses collaborateurs découvrirent que la vitamine liposoluble contenait deux facteurs diététiques : une vitamine facilement oxydable et une autre plus stable. La première, la vitamine A, se rencontre dans certains corps gras animaux et exceptionnellement chez les végétaux. La seconde est également rare ; elle est le plus abondante dans le foie de certains poissons : Morue, Flétan, Thon, dans le jaune d'œuf et dans un petit nombre de végétaux (champignons). A la suite des travaux de WINDAUS, ASKEW, BOURDILLON, la chimie de cette vitamine s'est approfondie. On connaît plusieurs vitamines D dont : la vitamine D₁ qui est une combinaison moléculaire de lumistérol inactif physiologiquement et de vitamine D₂. La vitamine D₃ est naturelle, la vitamine D₂ et la vitamine D₄ artificielles. Les formules suivantes montrent l'origine de ces corps.





Par réduction du cholestérol ordinaire on obtient le 7-déhydrocholestérol d'où dérive la vitamine D₃. Par irradiation ultra-violette de l'ergostérol on obtient la vitamine D₂ et des isomères tels que : le lumistérol, le tachystérol, le toxistérol, le suprastérol, le suprastérol 2 qui n'ont pas de propriétés antirachitiques. Dans les vitamines D₂ et D₃ il existe un cycle benzénique ouvert portant en chaîne latérale un groupement méthylénique. Seuls les stérols ayant cette structure sont doués d'activité physiologique. La vitamine D₄ est obtenue par irradiation ultra violette du 22-dihydroergostérol. C'est une dihydrovitamine D₂.

On ne peut encore doser avec précision par voie chimique les vitamines D, on titre leur activité par voie biologique. L'unité internationale de vitamine D adoptée à la conférence de Londres en 1931 et 1934 est : « l'activité antirachitique curative (chez le Rat) de un cm³ de la solution étalon d'ergostérol irradié à 0,01 p. 100, soit 1/10.000 de mg. ou 0 γ,1 de produit », soit à 0,025 γ de vitamine D₂. On a comparé l'activité des différentes vitamines D₂, D₃, D₄. Chez le Poussin la vitamine D de l'huile de foie de Morue est plus active que le produit D₂ seul ; elle est probablement identique à la vitamine D₃ de l'huile de foie de Thon. La vitamine D₄ est moins active chez le Rat que les vitamines D₂ et D₃, mais chez le Poulet son activité est intermédiaire à celles-ci. Mais comme les différences entre ces vitamines sont une question d'intensité et non de nature de leur action, on considère en physiologie et en médecine que « la vitamine D » doit être mise en cause dans tous les cas où l'on fait intervenir l'un quelconque des dérivés D₁, D₂, D₃ ou D₄. Il est indubitable que la vitamine D est un facteur étiologique du rachitisme. Des doses croissantes de vitamine D peuvent provoquer dans l'organisme des effets préventifs, curatifs ou toxiques. Des savants tels que : MOURIQUAND [60], LEULIER [60], HESS et STEENBOCK [40], et de nombreux autres, ont prouvé l'augmentation des dépôts minéraux dans les os rachitiques après l'administration de vitamine D. En 1932 SHERMANN [103] et STIEBLING ont fait des expériences montrant que la calcification était bien meilleure chez des animaux recevant un régime équilibré et, en outre, de la vitamine D. Nous verrons en détail dans un prochain chapitre les répercussions de l'action de la vitamine D sur le métabolisme phosphocalcique et ses propriétés thérapeutiques,

« La vitamine D exerce toujours dans les conditions où nous sommes placés une action favorable à la calcification des os longs, mais l'intensité et les modalités de celles-ci sont subordonnées à la composition saline du régime et à l'âge des animaux » (ROCHE et MARCELET [92]). Des Rats soumis à un régime équilibré et recevant de la vitamine D ont une croissance plus rapide et une calcification plus intense. Si l'alimentation des animaux est modérément déséquilibrée par excès de calcium la croissance et la calcification sont également activées par adjonction de vitamine D à ce régime, mais le bénéfice en est alors localisé aux os longs. Si les Rats reçoivent un régime riche en phosphore et en calcium mais contenant un léger excès de radicaux acides, l'administration de vitamine améliore la croissance et la calcification de l'ensemble du squelette. La vitamine D corrige toujours, dans une certaine mesure, les défauts du régime.

En provoquant et en étudiant le rachitisme chez des animaux, on peut espérer pouvoir appliquer les résultats obtenus au rachitisme humain. Il faut donc maintenant faire un parallèle entre le rachitisme expérimental et le rachitisme de l'homme.

III. — Etude comparée du rachitisme humain et du rachitisme expérimental.

La première question qui se pose est de savoir si le rachitisme infantile et le rachitisme expérimental sont identiques.

A. — LE RACHITISME HUMAIN ET LE RACHITISME EXPÉRIMENTAL SONT-ILS IDENTIQUES ?

Voici l'opinion de PARK [105] à ce sujet : « Les lésions osseuses, sont identiques, les conditions pathologiques qui existent dans le sang sont identiques ; le rachitisme produit expérimentalement chez les animaux peut être ou non accompagné de tétanie, exactement comme dans le rachitisme humain. Les mêmes mesures thérapeutiques sont efficaces dans les deux cas. Il n'y a aucun doute que le rachitisme expérimental soit la même maladie que le rachitisme humain ».

Il est en effet exact que les lésions pathologiques chez l'Homme et chez le Rat sont très voisines, sinon identiques.

Quelques auteurs comme BOUCAUMONT formulent néanmoins à cet égard des réserves. Dans les deux cas, il y a hypophosphatémie ; l'analyse des os, indique une réduction du poids des cendres et une diminution du pourcentage en calcium et en phosphore. Mais il semble bien que le mécanisme du processus métabolique qui les provoque soit différent.

Tandis que le rachitisme est régulièrement obtenu chez le Rat par ingestion d'un régime pauvre en phosphore, il est très rare que telle soit la cause de la maladie de l'enfant. Nous avons vu que les nourrissons élevés au biberon étaient plus facilement rachitiques que ceux élevés au lait maternel, cependant le lait de femme a un rapport : $\text{Ca/P} = 1,3$, et le lait de vache à 0,79, ce dernier étant plus riche en phosphore. Il faut peut être expliquer cette action favorable du lait de femme, non par le facteur antirachitique qu'il possède en quantité faible, mais par un équilibre des ions différents qu'il contient et qui influerait sur l'absorption et la rétention du calcium et du phosphore (NICOLAYSEN). Tous les pédiâtres savent bien qu'à partir d'une certaine quantité, plus on donne de lait à un enfant plus il a tendance à devenir rachitique, tandis qu'on ne peut provoquer cette affection chez des Rats en leur administrant beaucoup de lait (1). PARK [105] a mentionné que la même thérapeutique était applicable au rachitisme humain et au rachitisme expérimental. C'est ce que nous allons maintenant examiner.

B. — FAITS D'ORDRE THÉRAPEUTIQUE.

Alimentation en sels. — Il a déjà été constaté qu'un régime alimentaire ne contenant pas de phosphore et de calcium en quantité suffisante, et surtout n'ayant pas un rapport : Ca/P , voisin de 1,5 provoque le rachitisme. Quand le taux du calcium est trop élevé par rapport à celui du phosphore dans une alimentation pauvre en vitamine D, on constate que des lésions osseuses du type rachitique s'organisent et la croissance diminue. La teneur en phosphore du sérum qui est normalement de 5 à 6 mg. p. 100 chez le Rat tombe à 2,5 mg. p. 100 environ. La calcémie est ensuite affectée, mais à un

(1) Notons toutefois, que le Rat en croissance paraît beaucoup moins sensible aux facteurs de dystrophie osseuse que l'enfant. C'est uniquement pour des raisons de commodité qu'il a été choisi comme animal réactif pour l'étude des régimes rachitigènes, et non pour sa sensibilité particulière vis-à-vis de ceux-ci.

degré moindre. Il est un fait bien établi : si on ramène le rapport : Ca/P, à sa valeur optima pour permettre une bonne calcification, on obtient la guérison des lésions rachitiques chez l'animal. Mais ceci n'est pas réalisé pour le rachitisme humain. Dans ce cas lorsqu'on ajoute du phosphore au régime de l'enfant, on provoque un appauvrissement de l'organisme en calcium aboutissant à des lésions du squelette.

Vitamine D. — « Les aliments doivent en outre contenir nécessairement, chez l'enfant ou chez l'animal en croissance, des quantités minimales d'une substance n'intervenant pas elle-même dans l'édification du système osseux, mais tirant son importance de l'action qu'elle exerce sur la régulation du ravitaillement en sels de celui-ci » (ROCHE [84]). Il s'agit des vitamines D, dont nous allons envisager les effets thérapeutiques.

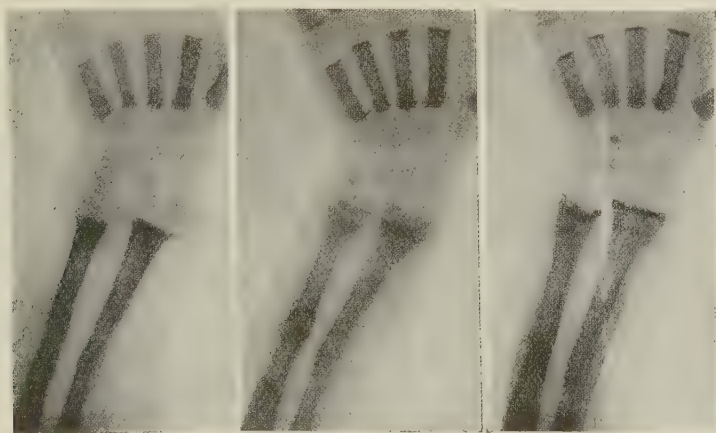


FIGURE 1. — Images radiographiques de l'avant-bras et de la main d'un enfant de huit mois. A : Rachitisme floride. B : Le même trois semaines après (fractures des os de l'avant-bras). C : Le même après trente-deux jours de traitement par la vitamine D (d'après ROMINGER).

MOURIQUAND, LEULIER [60] et leurs collaborateurs, ont étudié les caractéristiques thérapeutiques des « fixateurs du calcium » dont les plus actifs sont : la vitamine D et les rayons ultra-violets provoquant la formation de celle-ci. On peut considérer, comme l'a fait EDEL [18], l'action de ces fixateurs vis-à-vis du rachitisme infantile.

Le rachitisme floride, qui a déjà tendance à la guérison spontanée, est très sensible à ces fixateurs, c'est le rachitisme « uviosensible » ; on peut alors suivre à l'aide des rayons X la recalcification osseuse comme le montrent les clichés reproduits sur la figure 1.

Le rachitisme hypotrophique est « partiellement uviorésistant ». Il faut plusieurs séries de rayons ultra-violets ou de traitements à la vitamine D pour voir la recalcification s'effectuer. Enfin le rachitisme dystrophique peut être « uviorésistant vrai » ; il est alors réfractaire à toute thérapeutique. D'après PAPPENHEIMER [103] la guérison des lésions se fait ainsi : « Il se forme un dépôt de calcium dans la moitié distale du cartilage de conjugaison élargi (« Line test »), puis il y a envahissement par les vaisseaux sanguins, et destruction des cellules cartilagineuses ; des modifications du tissu ostéoïde, un commencement de lyse, une grande dilatation et une forte congestion des sinus sanguins de la région métaphysaire et un dépôt de calcium granuleux dans le tissu ostéoïde péri-chondral et péri-cortical s'opèrent ».



FIGURE 2. — Action curative de la vitamine D sur le rachitisme expérimental du Rat provoqué par déséquilibre du rapport : Ca/P, dans le régime (d'après ROMINGER). Noter la diminution progressive de la largeur du cartilage de conjugaison sous l'influence du traitement (de gauche à droite).

L'huile de foie de Morue agit par la vitamine D qu'elle contient, son pouvoir fixateur du calcium est plus faible que celui de la vitamine D employée seule, mais son action eutrophique chez l'Homme est plus grande ; peut-être tient-elle à la vitamine A. La vitamine D relève la calcémie et la phosphatémie chez les rachitiques. Ce traitement, augmente la

résorption intestinale du calcium, ainsi que celles des phosphates (NICOLAYSEN [63]). Si la dose de vitamine administrée est trop considérable, les sels du squelette libèrent dans le sang des ions PO_4^- et Ca^{++} qui sont alors en excès. Cette déminéralisation se produit dans les cas « d'hypervitaminose ». En étudiant l'action de la vitamine D sur des animaux rachitiques, on a constaté que des Rats soumis à un régime salin déséquilibré, étaient guéris après traitement par la vitamine D, sans qu'il ait été nécessaire de modifier leur alimentation. C'est là ce qu'illustrent les radiographies de la figure 2.

Toutefois une thérapeutique dont les bienfaits sont certains sur un organisme animal rachitique peut, dans certains cas, ne donner aucun résultat sur le rachitisme humain. L'existence d'un rachitisme uviorésistant et l'inefficacité d'une alimentation équilibrée chez l'enfant rachitique, nous obligent à conclure à la *plus grande complexité du rachitisme humain*. Beaucoup de facteurs étiologiques du rachitisme humain sont encore inconnus. Ses causes sont multiples, et des troubles non seulement exogènes, mais aussi endogènes, peuvent le provoquer. Le rachitisme expérimental est un processus plus simple, mais dans lequel entrent en jeu des facteurs que l'on retrouve dans le rachitisme humain.

IV. — Etat actuel de nos connaissances sur l'origine du rachitisme.

Le rachitisme se manifestant par des lésions osseuses il faut avant d'étudier le mécanisme qui les provoque, examiner comment se forme normalement la substance osseuse. Nous l'avons fait à partir du rapport présenté à ce sujet par A. POLICARD et J. ROCHE [72] à la Réunion de l'Association des Physiologistes de langue française de 1937 (Paris).

A. — FORMATION DE LA SUBSTANCE OSSEUSE.

1. *Mécanisme histologique général.* — La formation de cette substance est un problème d'histogénèse. On voit se produire un remaniement du territoire conjonctif : les fibrilles collagènes s'orientent, se condensent et forment la trame des futures travées osseuses, elles présentent alors un œdème spécial. Le territoire conjonctif devient homogène, d'une ré-

fringence particulière ; il est comme imprégné d'une substance préosseuse (POLICARD et LERICHE [70]). Ceci se produit immédiatement avant le dépôt des sels. L'infiltration calcaire de la matrice conjonctive se fait rapidement, il y a passage direct de « l'état mou » à « l'état dur ».

2. *Composition de la substance osseuse.* — La matrice préosseuse, est une substance protéique. Cette protéine appartient au groupe des substances chondroïdes ou chondroprotéides. On sait peu de choses sur elle. Toutefois on peut la rapprocher de l'oséomucoïde, extrait de l'os décalcifié. Elle serait analogue à la mucoprotéine du cartilage. Elle joue un rôle capital dans l'ossification.

Voyons maintenant quelle est la nature du dépôt salin constituant la partie minérale de la substance osseuse. Sa composition est très complexe. L'os contient en effet du phosphate de calcium, du carbonate de calcium, des sels alcalins et de nombreux métaux et métalloïdes. Mais la minéralisation du squelette n'englobe que le dépôt des sels les plus importants. Les travaux de GABRIEL [29] et de MORGULIS [62] montrent que le « Sel de l'os » est formé principalement d'un phosphate et d'un carbonate de calcium, les autres composés étant secondaires. En admettant que tout l'acide carbonique de la substance osseuse soit à l'état de carbonate de calcium, il existe dans l'os un excès de calcium ou calcium résiduel. Si d'autre part on tient compte du fait qu'une partie du phosphore donne $(\text{PO}_4)_2 \text{Mg}_3$ il subsiste dans l'os un excès de phosphore dit résiduel. Le rapport : calcium résiduel/phosphore résiduel, oscille entre 1,99 et 2,12. Or pour $(\text{PO}_4)_2 \text{Ca}_3$, $\text{Ca/P} = 1,93$. Le constituant fondamental de l'os est donc $(\text{PO}_4)_2 \text{Ca}_3$, phosphate tricalcique, et par ailleurs, le rapport : Ca/P , trouvé étant supérieur au rapport théorique, MORGULIS [62] a pensé qu'il y avait en outre de petites quantités de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, ou de CaF_2 . A ces recherches il faut associer les noms de : SHEAR, KRAMER [101], KLEMENT [42], GASSMANN [30], ROSEBERY [95], MORGULIS [67], MAREK, WELLMANN, URBANYI [49]. HOPPE-SEYLER [38] (1862) a établi que le rapport : phosphore total/calcium total de l'os, est dans les proportions de 6 atomes de phosphore pour 10 atomes de calcium, exactement comme dans les apatites naturelles. Le spectre de rayons X prouve également qu'il y a dans l'os des combinaisons microcristallines du type apatite : $3 (\text{PO}_4)_2 \text{Ca}_3 \cdot \text{XCa}$, où $\text{X} = \text{CO}_3$

ou F_2 , ou Cl_2 , ou $(OH)_2$ (de JONGH, TAYLOR, SHEARD). La plus abondante est la carbonatoapatite : $3 (PO_4)_2Ca_3 \cdot CO_3Ca$. Mais la composition minérale d'un os n'est pas rigoureusement constante et à ce sujet rapportons l'opinion d'A. ROCHE et I. GARCIA : « Il est possible qu'un mélange d'apatites microcristallines constitue l'élément minéral d'une substance osseuse fondamentale, dans laquelle les diverses apatites sont à un certain degré interchangeables. Par contre les matériaux amorphes formeraient à côté, un dépôt plus mobilisable, véritable réserve prête à entrer en jeu pour amener l'équilibre : acide/base ». Après avoir étudié la composition de la substance osseuse, on doit se demander comment sont apportés à l'os et d'où viennent les matériaux servant à l'édification des sels.

3. *Apport des matériaux calcaires.* — La matrice protéique de la substance osseuse, va se calcifier grâce à l'apport de matériaux inorganiques véhiculés par les humeurs, et qui sont des sels ou résorbés par l'intestin, ou mobilisés à partir des réserves tissulaires.

PHÉNOMÈNES HISTOLOGIQUES. — Histologiquement on voit le dépôt de calcium se faire progressivement à l'intérieur de la travée de substance préosseuse. Certains auteurs avaient pensé que le calcium était élaboré à l'état de grains par les cellules voisines : les ostéoblastes. Au niveau des tissus en voie d'ossification la circulation est faible et le calcium ionisé traverse alors très facilement la paroi des capillaires. Enfin il peut y avoir un apport de calcium d'origine locale (« mutations calciques locales »). Après cet aperçu histologique, considérons le côté biologique de la question.

ASPECT BIOCHIMIQUE DU PROBLÈME. — La première question qui se pose au sujet de l'apport humoral du matériel minéral, est de savoir quels sont les constituants du sang participant au processus de l'ossification ? La seconde question est la suivante : Existe-t-il au niveau de la substance osseuse un mécanisme d'enrichissement local en corps aptes à faciliter la calcification ?

Les constituants du sang participant à la calcification sont les ions : $PO_4^{=}$ et Ca^{++} en quantité minime, provenant de l'alimentation ou des réserves tissulaires ; les ions $CO_3^{=}$ et CO_3H^- , ainsi que CO_3H_2 provenant des cellules, qui en oxy-

dant les matières organiques leur donnent naissance en grande quantité. Le sang peut apporter également de petites quantités de sels non dissociés, tels que du carbonate de calcium et du phosphate de calcium.

Le plasma de l'Homme, des Mammifères contient : 3 à 6 mg. de phosphore minéral (phosphates) par 100 cm³ et 10 à 12 mg. de calcium par 100 cm³. L'hypothèse consistant à penser que le phosphore et le calcium se trouveraient dans le sang uniquement sous forme d'ions $\text{PO}_4^=$ et Ca^{++} (supposant ainsi que le plasma est sursaturé en phosphate de calcium) ne semble pas acceptable. On peut alors envisager que dans le plasma et les humeurs se trouvent des combinaisons calciques et des phosphates minéraux ou colloïdaux. De nombreuses expériences sur ce sujet ont été faites, par RONA, TAKAHASHI [94], CUSHNY, NEUHAUSER et PINKUS, BRULL, EICHOLTZ, STARLING, GROLLMANN, LARSON, TUFTS. Il semble que les phosphates sériques soient à peu près complètement diffusibles et ionisés et passent dans les humeurs avec une petite quantité d'esters phosphoriques. Environ 60 à 70 p. 100 du calcium sérique diffusent dans les humeurs, 30 à 40 p. 100 étant à l'état de protéinates ou adsorbés aux protéines. SCHMIDT et GREENBERG pensent que l'on doit considérer la totalité de la fraction diffusible comme étant ionisée, mais BENJAMIN et HESS disent avoir démontré l'existence de combinaisons phosphocalciques non dissociées et diffusibles. Nous voyons donc l'importance pour le ravitaillement de l'os des ions $\text{PO}_4^=$ et Ca^{++} , et des sels qui sont en équilibre avec eux et se forment à leurs dépens.

Avec la question de l'enrichissement local en ions $\text{PO}_4^=$ et Ca^{++} nous abordons le problème de la phosphatase, qui sera développé ultérieurement, notre travail portant principalement sur l'étude de cet enzyme. Signalons toutefois dès maintenant que la phosphatase est un agent accélérateur de la formation du phosphate tricalcique ; elle hydrolyse spécifiquement les esters phosphoriques et libère PO_4H_3 et l'alcool qui est combiné à celui-ci.

En résumé l'aspect biochimique général du processus d'ossification se présente ainsi : Le phosphate tricalcique étant très faiblement soluble, les humeurs en contiennent peu à l'état de $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$ et peu d'ions $\text{PO}_4^=$ et Ca^{++} sont en équilibre avec les molécules non dissociées. Dans ce cas la loi d'action

de masse prévoit que le produit des concentrations de Ca^{++} et de $\text{PO}_4^{\equiv}$ est constant :

$$[\text{PO}_4^{\equiv}]^2, [\text{Ca}^{++}]^3 = S = \text{constante}$$

La constante S, produit des concentrations des ions en présence est le produit de solubilité, défini pour des conditions de température et de pression déterminées. S'il y a une augmentation des ions $\text{PO}_4^{\equiv}$ ou Ca^{++} , on obtient la précipitation de $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$. Le phosphate tricalcique peut s'associer par la suite au carbonate de calcium et il se forme alors *in situ* de la carbonatoapatite, $3 (\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3, \text{CO}_3\text{Ca}$.

4. *Fixation des sels de l'os à leur support organique.* — C'est là une partie du processus de l'ossification dont l'étude pose actuellement de nombreux problèmes dont la solution demeure à trouver. Nous venons de voir que le « sel de l'os » ne peut se former que s'il y a une surcharge locale en ses ions : c'est ce que l'on obtient par l'action de la phosphatase qui fait augmenter la concentration des ions $\text{PO}_4^{\equiv}$ dans les territoires où elle agit. Le sang apporte du calcium à faible concentration et pour obtenir la calcification il faut un taux assez élevé de ce métal au niveau de l'os, ce qui ne peut être réalisé sans une affinité spécifique de la matrice préosseuse pour les sels de calcium.

ASCHOFF, concluait de ses expériences dès 1902 : « Pour qu'il y ait incrustation de calcium en un point, il doit s'y former une substance organique présentant une grande affinité pour le calcium, l'élévation de la teneur du sang en calcium n'étant pas le seul facteur nécessaire aux précipitations calciques ». Viennent ensuite les travaux de PFAUNDLER et WELLES ; le premier admettant qu'il y a dans les tissus étudiés, une substance « calcaffine » et pensant qu'il s'agissait d'une adsorption sélective à celle-ci, et non d'une fixation chimique. WELLES et BENSON ont confirmé cette opinion tandis que FREUNDENBERG et GRÖRGY [26], considèrent qu'il se fait une véritable réaction chimique entre la protéine (électrolyte amphotère) de la matrice calcaffine et le calcium du milieu ; mais ceci ne peut être encore démontré.

Des différentes conditions qui permettent le dépôt et la fixation des sels, dans la substance préosseuse, il faut retenir, que la tension de l'acide carbonique dans les humeurs doit pouvoir agir sur la précipitation du sel, si celui-ci est un

phosphocarbonate, ce qui n'est pas encore éclairci. D'autre part une certaine alcalinité du milieu favoriserait la calcification, mais existe-t-elle ? Enfin, la substance osseuse est le siège d'incessants remaniements, ce qui complique son étude.

B. — ORIGINE DU RACHITISME.

Connaissant l'essentiel d'une ossification normale, il convient d'étudier quels sont les facteurs qui sont modifiés dans le cas pathologique qui nous intéresse. Quelle est l'origine du rachitisme ?

Le tableau suivant emprunté à ROMINGER [93] montre les variations des bilans digestifs du phosphore et du calcium (exprimés en P_2O_5 et en CaO) au cours de l'évolution du rachitisme humain.

Nous voyons que les troubles de la calcification sont essentiellement marqués par une baisse précoce du bilan phosphoré (il y a également hypophosphatémie), la perturbation du métabolisme du calcium étant toujours postérieure. Les troubles du métabolisme digestif du phosphore se produisent en premier lieu et sont plus considérables. Par quel mécanisme les dystrophies osseuses peuvent-elles se produire ? Elles relèvent soit d'un dérèglement de l'apport en sels, soit d'un dérèglement dans la fixation de ceux-ci.

Or, l'apport des sels à la substance osseuse se fait par l'intermédiaire du sang, chargé de matériaux inorganiques, notamment de sels résorbés par l'intestin. On peut donc voir une origine intestinale à ces dystrophies ou envisager leur origine strictement osseuse. « L'effet favorable ou nocif d'un régime sur la calcification et sur le développement des os, est lié d'une part à la résorption de ses constituants et d'autre part à leur rétention » (ROCHE [80]).

1. ORIGINE INTESTINALE :

a) *Ravitaillement en sel.* — Une alimentation dont les facteurs salins sont déséquilibrés est génératrice de lésions osseuses. Dans un régime où il y a excès de calcium ($Ca/P > 3$), celui-ci est incomplètement résorbé et entraîne dans les matières fécales des ions phosphoriques d'origine endogène. Le calcium est ainsi excrété à l'état de phosphate ; c'est alors que le squelette se déminéralise ou voit sa croissance arrêtée.

TABLEAU II.
*Evolution générale des diverses manifestations du rachitisme
infantile (ROMINGER).*

Phase de l'évolution	Bilan de P_2O_5	Bilan de CaO	Signes cliniques et radiographiques
1 ^{re} phase	Beaucoup plus mauvais que normalement	Normal ou approximativement normal	Pas de signes de rachitisme où à peine com- mencement d'évolution.
2 ^e phase	Plus mauvais que normalement	Plus mauvais que normalement	Cliniquement et aux Rayons X rachitisme pro- noncé.
3 ^e phase	Anormalement positif	Plus mauvais que normalement	Cliniquement, changement dans l'état général, et aux Rayons X commencement de dépôt calcaire.
4 ^e phase	Anormalement positif	Anormalement positif	Guérison clinique avancée, aux Rayons X dépôt calcaire en longues bandes.

Avec un régime contenant un excès de phosphore ($\text{Ca/P} < 1$) on a une perte en calcium, bien que la résorption intestinale de ce corps augmente avec la diminution du rapport : Ca/P , mais une partie de ces ions PO_4^- résorbés est rejetée par les urines sous forme de PO_4CaH . Ce régime ne provoque d'ailleurs pas aussi facilement des lésions osseuses que le précédent. De plus, la présence dans les aliments d'un excès de glycérides (graisses neutres) peut gêner la résorption du calcium. Enfin, un régime contenant un excès de radicaux acides provoque des troubles de l'ossification : la résorption des phosphates n'est alors pas suivie de leur rétention et il y a une abondante phosphaturie. Si l'alimentation contient un excès de base, le calcium qu'elle apporte est excrété en partie par les fèces combiné à des radicaux phosphoriques perdus par les os.

Tous ces éléments participent directement à l'apport du matériel phosphocalcique. Tandis que la vitamine D exerce son action sur la régulation du ravitaillement en sels, le besoin en vitamine D est lié à la nature du régime (J. ROCHE et Y. MARCELET [92], MARCELET [52]).

b) *Vitamine D*. — Depuis les travaux de BRUCE et de CALLOW [12] on sait que la vitamine D fait régresser les lésions rachitiques. Le rachitisme par avitaminose D serait dû au défaut de résorption du calcium et du phosphore et NICOLAYSEN [64] (1937) a montré que la vitamine D, régularise l'absorption de calcium par l'intestin, et secondairement celle des phosphates, ce qui entraîne une augmentation du taux de ces sels dans le sérum. Ainsi les rachitiques, qui sont en général hypocalcémiques et hypophosphatémiques présentent après avoir reçu une certaine quantité de vitamine D une calcémie et une phosphatémie normales. Au niveau des os on constate alors une précipitation des sels phosphocalciques supérieure à celle observée chez les animaux, ce qui différencie la guérison provoquée par la vitamine D de la guérison spontanée ou de celle due à un apport de phosphates. En outre la guérison est plus rapide.

L'action de la vitamine D se marque beaucoup plus sur un organisme jeune en croissance que chez un adulte (ROCHE et MARCELET [92], MARCELET [52]). Selon TAYLOR [45], WELD et SHYKES, la vitamine D interviendrait en outre sur l'aptitude du tissu osseux néoformé à fixer des sels, chez l'ani-

mal en croissance. BÉNARD parle « de l'action squelettique et de l'action intestinale » de la vitamine D. On ne peut préciser si l'action squelettique est directe ou se fait par l'intermédiaire d'une hormone (thyroïdienne, parathyroïdienne ou autre).

Nous avons exposé au début de ce chapitre, que le rachitisme pouvait avoir soit une origine intestinale, ce que nous venons d'examiner, soit une origine osseuse résidant dans le dérèglement de la fixation des sels. C'est ce qu'il nous reste à envisager.

2. ORIGINE OSSEUSE :

Les lésions osseuses étant marquées par une déficience en phosphore, on peut supposer alors qu'un dérèglement peut survenir dans le mécanisme d'enrichissement local en ions $\text{PO}_4^{=}$; c'est-à-dire dans le « mécanisme phosphatasique » du processus d'ossification. Les variations de l'activité de cet enzyme au cours du développement du rachitisme expliquent peut être la production des lésions osseuses.

Il peut y avoir d'autre part une moindre aptitude de l'os à fixer les ions Ca^{++} et $\text{PO}_4^{=}$.

Nous avons vu dans l'étude de la formation de la substance osseuse que le mécanisme de fixation du sel de l'os n'est pas encore bien élucidé et qu'il existe de nombreuses controverses à ce sujet. Le problème posé par la fixation des sels demeure entier. On peut toutefois dire qu'il faut envisager ce mécanisme générateur de dystrophies osseuses sous deux aspects : celui de l'ostéolyse, correspondant à une perte de sels antérieurement fixés, celui de la diminution de l'aptitude de la substance osseuse à se charger en phosphate tricalcique.

V. — Objet du travail.

Dans cette introduction nous nous sommes appliqués à donner une vue d'ensemble de nos connaissances acquises sur le rachitisme. A côté de formes cliniques bien définies, d'une thérapeutique assez précise, nous en connaissons d'autres dont le mécanisme étiologique nous échappe et dont la thérapeutique est difficile à organiser ; c'est pour essayer de l'éclaircir que nous avons fait les quelques expériences que nous allons exposer.

Nous allons aborder nos recherches sur l'origine osseuse du rachitisme en étudiant successivement :

1° *Les variations de l'activité phosphatasique des os au cours du rachitisme expérimental, afin d'établir si celui-ci est ou non en relation avec un appauvrissement des os en phosphatase.*

2° *L'affinité de la substance préosseuse pour les ions phosphorique et calcium dans le rachitisme expérimental, afin de déceler dans quelles mesures l'aptitude de l'os à fixer des sels varie au cours du rachitisme.*

Chacune des phases de l'ossification auxquelles participent ces phénomènes peut en effet être touchée par le rachitisme et l'on peut espérer par cette étude localiser sur l'un ou l'autre des éléments de l'ostéogénèse les troubles aboutissant à l'organisation des lésions rachitiques.

RECHERCHES PERSONNELLES

PREMIÈRE PARTIE.

La phosphatase des os dans le rachitisme expérimental.

I. — Généralités sur la phosphatase des os.

Divers auteurs, notamment GROSSER, HUSLER, PLIMMER, TOMITA, avaient constaté la présence d'un enzyme hydrolysant les esters phosphoriques dans différents tissus animaux. Mais les premières recherches importantes sur la phosphatase des os sont celles de ROBISON [75] qui montra en 1923 le rôle de celle-ci dans l'ossification du squelette.

Préparation de la phosphatase. — La phosphatase peut être obtenue en solution colloïdale en faisant macérer dans de l'eau chloroformée des os de jeunes Rats en croissance dont on a enlevé la moelle. Abandonnés ainsi plusieurs jours à la température ordinaire les extraits obtenus peuvent être purifiés, suivant le procédé de MARTLAND et ROBISON [55]. La préparation contient alors la totalité de l'activité phosphatase et se conserve pendant plusieurs mois si elle a été obtenue dans de bonnes conditions.

Propriétés de la phosphatase des os. — Cet enzyme présente un optimum d'action à 37° à pH = 9,5 ; mais il est rapidement détruit aux pH supérieurs à 9, aussi durant des expé-

riences de plusieurs heures à 37° le pH optimum observé est-il de 8,6-8,8. L'action hydrolysante de la phosphatase s'exerce sur tous les monoesters phosphoriques. Sa spécificité n'est donc pas très marquée. Les acides hexosemonophosphorique et diphosphorique, monophénylphosphorique, α et β -glycérophosphoriques sont les esters les plus facilement dédoublés par la phosphatase, le β glycérophosphate étant plus sensible à son action que l' α glycérophosphate. L'enzyme peut avoir son activité augmentée ou inhibée. Des activateurs tels que l'ion Mg^{++} à faible concentration (ERDTMANN [19], JENNER et KAY [41]) des acides aminés, (BODANSKY [8]), des polypeptides se trouvent dans les tissus. Les fluorures, les oxalates dont des inhibiteurs (BELFANTI, CONTARDI et ERCOLI [2]). De plus l'activité phosphatasique diminue du fait même de la présence des corps auxquels elle a donné naissance. D'après la classification de FOLLEY et KAY [25], la phosphatase des os est une phosphomonoestérase du type A_1 .

Cependant on se demande si c'est un même enzyme ou un mélange d'enzymes que l'on rencontre dans les divers organes contenant la phosphatase A_1 . Si l'on se reporte aux travaux de ROCHE et LATREILLE [90], il est possible d'en séparer par adsorption spécifique des préparations inactives vis-à-vis de certains monesters, comme si l'on se trouvait en présence d'un mélange d'enzymes. D'autre part, si l'on considère la teneur en phosphatase du sérum, ou du plasma on se rend compte qu'elle est influencée par un apport osseux, intestinal, rénal, leucocytaire, d'enzyme. A la suite des recherches de BELFANTI, CONTARDI, ERCOLI [2], il est prouvé que cette phosphatase, inhibée par les oxalates ou les fluorures, ne présente pas des caractères rigoureusement identiques dans les divers organes il faut alors supposer qu'il existe plusieurs catégories de phosphomonoestérases A_1 . L'individualité de la phosphatase des os n'est donc pas entièrement éclaircie, cependant on peut déjà étudier son rôle physiologique.

Rôle physiologique de la phosphatase des os. — ROBISON [75] avait signalé que la région épiphysaire des os longs contenant le cartilage de conjugaison, et la métaphyse de ceux-ci, étaient riches en phosphatase chez les jeunes Rats en croissance. Son étude fut poursuivie par POLICARD, PÉHU, ROCHE, et BOUCAUMONT [71] qui ont précisé la localisation histologi-

que de cet enzyme, localisation indiquant qu'il doit participer à la calcification.

L'expérience initiale de ROBISON est la suivante : une coupe fraîche d'une épiphyse de Rat en croissance est immergée dans une solution d'hexosemonophosphate de calcium. Il se forme alors par hydrolyse de l'ester monophosphorique des ions PO_4^- . Ceux-ci réagissent avec les ions Ca^{++} du milieu pour donner naissance à du phosphate tricalcique qui se dépose dans le cartilage de conjugaison. Si la coupe d'os a été chauffée au préalable à 60° , il ne se fait plus de calcification, le mécanisme phosphatasique ayant été inactivé par la chaleur. Mais si on immerge cet os chauffé dans une solution contenant des ions PO_4^- et Ca^{++} , le phosphate tricalcique se dépose. Les ions carbonique et bicarbonique favorisent ce processus. Les expériences de calcification *in vitro* de ROBISON et ses collaborateurs, SOAMES, ROSENHEIM [78] et FELL [20] mettent en évidence la différence existant entre la *formation* du sel de l'os et sa *fixation*. La phosphatase, facteur d'enrichissement local en ions PO_4^- a un rôle très actif dans la première.

Dans le cartilage de conjugaison des os longs d'un fœtus de Mammifère ou d'Oiseau on voit apparaître en quantité notable cet enzyme au début de l'ossification (FELL et ROBISON [20]). De même au début de la calcification dentaire (ROCHE et BULLINGER [87]). Si on greffe des fragments d'épithélium vésical de chien sur la paroi abdominale, seuls ceux qui font de l'os contiennent beaucoup de phosphatase (HUGGINS, LERICHE). Au cours de l'étude de la formation de la substance osseuse, nous avons vu que le plasma apporte aux humeurs des ions calcium et phosphorique, mais il apporte en outre, au taux de 0,5 à 1 mg. de phosphore p. 100 cm^3 dans des esters phosphoriques (ROBISON, ROCHE). Bien qu'en faible quantité ces esters phosphoriques sont importants parce qu'ils sont renouvelés sans cesse par le sang. Les phosphatases les hydrolysent et, de ce fait la précipitation du phosphate de calcium s'amorce, certains éléments de l'os fixant sélectivement ce dernier par la suite.

Le schéma suivant de ROBISON résume le processus de la calcification :

Plasma sanguin.

Solution saturée de « Sel de l'os »
renfermant des esters phosphoriques
 $[\text{PO}_4^{\equiv}]^2 \cdot [\text{Ca}^{++}]^3 = \text{S} = \text{produit de solubilité}$



Lymphes interstitielle (au contact de l'os)

Par action de la phosphatase
sur les esters (libération de $\text{PO}_4^{\equiv}$)
le milieu devient sursaturé en « Sel de l'os »
 $[\text{PO}_4^{\equiv}]^2 \cdot [\text{Ca}^{++}]^3 > \text{S}$



Tissu calcifié

$(\text{PO}_4)_2 \text{Ca}_3$ (phase solide).

L'enzyme étudié a donc pour seule fonction physiologique d'enrichir en ions $\text{PO}_4^{\equiv}$ les humeurs baignant la substance préosseuse.

II. — Phosphatase des os et rachitisme.

Avant d'étudier les modifications pathologiques de l'activité phosphatasique des os, dans le cas du rachitisme, voyons quelles en sont les variations physiologiques en abordant la question sous l'angle quantitatif.

Les recherches de ROBISON et FELL [20], MARTLAND [53], SOAMES sont intéressantes. Les épiphyses des animaux jeunes sont plus riches en phosphatase que les os des adultes. La teneur est également élevée dans les centres d'ossification des os fœtaux. C'est à la même conclusion que parviennent ROCHE, FILIPPI et LÉANDRI [89], dans un ensemble de recherches sur la teneur en phosphatase des os chez le Rat aux diverses périodes de la vie. Toutefois, on ne sait s'il faut attribuer entièrement la diminution observée de l'activité enzymatique des os avec l'âge au ralentissement de l'activité des cellules sécrétoires. En effet l'activité de cet enzyme, que l'on rencontre dans les épiphyses et la diaphyse des os longs, dans les territoires d'ossification haversiens, membraneux endo-

chondral, tient non seulement à la quantité d'enzymes mais aussi à la présence d'activateurs et d'inhibiteurs spécifiques. C'est ainsi que les os des animaux adultes sont en général très pauvres en activateurs et voient, de ce fait, leur pouvoir phosphatasique renforcé par les ions Mg^{++} , tandis que les os des animaux jeunes activés au maximum *in situ*, sont peu sensibles à la présence d'ions Mg^{++} *in vitro* (ROCHE, FILIPPI et LÉANDRI).

ROBISON et SOAMES, ROBISON et MARTLAND [53] ont signalé que les os rachitiques du Rat paraissent plus riches en enzyme que ceux d'animaux normaux. Par ailleurs POLICARD, PÉHU, ROCHE et BOUCAUMONT [71] étudièrent la répartition histologique de l'enzyme et sa teneur dans la zone juxtaépiphyssaire ; ils ont constaté que seules les zones ossifiables sont riches en phosphatase et que cet enzyme loin de faire défaut au rachitique humain semblait être particulièrement abondant chez celui-ci. La teneur du sérum en phosphatase est également très forte, la principale origine de l'enzyme sérique semblant devoir être recherchée dans les os.

Toutefois les conclusions relatives à l'os méritent d'être renforcées par de nouvelles expériences car elles sont basées sur des mesures où la teneur en phosphatase a été rapportée au poids des os, or celui-ci est largement fonction du degré de minéralisation des pièces squelettiques, lequel n'est identique dans l'os normal et dans l'os rachitique, aussi nous a-t'il paru utile de reprendre ces recherches à l'aide de la méthode de ROCHE, FILIPPI et LÉANDRI [89], laquelle rapporte l'activité phosphatasique au stroma protéique des pièces osseuses et non à l'os total, dont le degré de minéralisation est essentiellement variable.

Nous allons exposer ici le plan de notre travail sur les variations de l'activité enzymatique des os au cours du rachitisme.

III. — Plan de recherches.

Nous nous proposons de doser l'activité phosphatasique dans :

1° les os longs des animaux, (épiphyses, cartilages de conjugaison et diaphyses) depuis le début du rachitisme jusqu'à la période de guérison spontanée ;

2° les os plats d'origine endochondrale ou membraneuse, pendant la même période ;

3° les os longs et plats de certains animaux en présence d'ions magnésium, lesquels sont activateurs de la phosphatase des os quand celle-ci n'est pas activée naturellement *in situ*, ceci afin de nous faire une idée sur le degré d'activation de la phosphatase chez le rachitique.

Dans tous les cas nous avons comparé les résultats obtenus à ceux donnés par des dosages effectués sur des os de Rats normaux de même poids.

IV. — Marche des expériences et techniques.

Nous avons soumis des Rats blancs âgés de quelques semaines à peine au régime rachitigène de RANDOIN et LECOQ [74]. Les animaux mis en expérience étaient d'un poids compris entre 25 et 60 grammes ; en pleine croissance ils sont très sensibles aux facteurs étiologiques des dystrophies osseuses et leurs os sont rapidement le siège de lésions rachitiques.

Les Rats ont été placés dans des cages à fond grillagé, au-dessous duquel se trouve un tiroir où tombent les excréments. Comme nourriture ils reçoivent à volonté de l'eau, et le régime rachitigène de RANDOIN et LECOQ, dont voici la composition :

Peptone de muscle	17
Levure de bière sèche.....	3
Graisse de beurre purifiée.....	5
Huile d'olive	5
Saccharose	65
Mélange salin de PAPPENHEIMER (1)...	4
Lactate de calcium	1
Aliment encombrant (sciure lavée)....	5 p. 100

Le régime administré a un rapport : Ca/P voisin de 3, il est donc déséquilibré par excès de calcium. Chez des animaux

(1) Le mélange salin de PAPPENHEIMER se compose de :

Chlorure de potassium	0,85
Carbonate de sodium	0,85
Lactate de calcium	2,00
Citrate de fer	0,10
Iodure de potassium	0,0002
Sulfate de manganèse	0,00078
Chlorure de sodium	0,00024
Alun de potassium	0,00024

très jeunes on peut observer des troubles au niveau du cartilage de conjugaison quarante-huit heures après les avoir soumis à ce régime rachitigène. Nous avons commencé nos prélèvements, vers le sixième ou le dixième jours de l'expérience les animaux étant pesés et asphyxiés au gaz d'éclairage. On prélève alors différents organes osseux. Les os longs : bien nettoyés, grattés, sont divisés en trois fragments : épiphyse supérieure, épiphyse inférieure, diaphyse, dont on enlève la moelle osseuse. Ces différentes parties sont lavées dans une solution de chlorure de sodium à 9 g. p. 100, puis soigneusement éponnées avant d'être pesées. Un fémur et un tibia serviront au dosage de l'ion $\text{PO}_4^{=}$ libéré par l'action de la phosphatase de ces os sur une solution d'ester phosphorique. L'autre fémur et l'autre tibia seront utilisés pour le dosage de l'azote. Les os plats : omoplate, voûte crânienne et les dents (incisives) sont également prélevés en vue des mêmes dosages.

DOSAGE DE L'ACTIVITÉ PHOSPHATASIQUE DES OS.

Ce dosage a été mis au point, par J. ROCHE et FILIPPI [88]. Il est basé sur la mesure de l'activité phosphatasique et sur le dosage de la teneur en azote de l'os, et son principe est le suivant : Le teneur en phosphatase de l'os est rapportée à son stroma protéique, considéré indépendamment des sels minéraux qui y sont déposés. Les mesures ainsi effectuées donnent des résultats bien plus précis que ceux des méthodes antérieures employées par ROBISON [75] et qui rapportent l'activité enzymatique au poids de l'os ; d'où l'erreur introduite dans le calcul de l'activité phosphatasique par la variabilité de la charge calcaire de l'organe.

Le fragment osseux à étudier est immergé pendant 18 heures à 37° dans 12 cm³ d'une solution de β -glycérophosphate de sodium contenant 1 mg. de phosphore par cm³, et dont le pH, égal à 8,8, a été ajusté par addition de soude et contrôlé colorimétriquement. Le milieu est saturé de chloroforme afin d'éviter une pullulation microbienne. On dose par la méthode de BRIGGS-ROBISON les phosphates présents, et on calcule la quantité d'acide phosphorique libérée par l'hydrolyse du substrat. Les témoins (phosphore cédé au milieu par l'os) sont négligeables.

L'azote (presque exclusivement protéique) de l'os homologue est dosée par la méthode de Kjeldahl (microkjeldahl avec minéralisation sulfurique en présence du catalyseur au sélénite de mercure de DUMAZERT et MARCELET), il suffit par la suite de calculer la quantité d'azote contenue dans le fragment osseux qui a servi au dosage BRIGGS-ROBISON pour rapporter à 100 mg. d'azote osseux l'activité phosphatasique relative A, donnée par l'expression :

$$A = \frac{\text{mg. P libérés} \times 100}{\text{mg. N contenus dans le fragment osseux}}$$

V. — Résultats expérimentaux.

Nos recherches ont été poursuivies sur trente-deux Rats, pesant environ de trente à quatre-vingt grammes au début de l'expérience et répartis en trois séries.

PREMIÈRE SÉRIE. — Nos Rats ont été mis au régime RANDOIN et LECOQ ; sept jours après, le premier a été sacrifié et l'activité phosphatasique dosée dans les os précités. Les autres ont été tués de quatre en quatre jours à partir du dixième, l'expérience durant en tout 38 jours.

DEUXIÈME SÉRIE. — Onze Rats ont été sacrifiés du dixième au vingt-septième jour de régime.

TROISIÈME SÉRIE. — Douze Rats rendus rachitiques furent tués du sixième au vingt-huitième jour de régime.

Nous avons suivi les variations de l'activité phosphatasique en fonction de l'évolution du rachitisme animal et chez des animaux normaux témoins, de même poids. Tous les résultats ont été groupés en dix tableaux. Quatre de ceux-ci (IV, V, VI et VII) contiennent les variations de l'activité enzymatique des os longs dans les épiphyses (cartilages de conjugaison) et la diaphyse, quatre autres (III, IX, X et XI) groupent les activités phosphatasiques des os plats. Enfin, on trouvera dans les tableaux VIII et XII, des résultats sur l'activité enzymatique des os en l'absence ou en la présence d'ion magnésium à la concentration activatrice optima (JENNER et KAY [41]). Cet ion a été introduit dans certaines expériences, par addition au mi-

lieu d'hydrolyse (12 cm³) de 0,5 cm³ d'une solution de sulfate de magnésium titrant 0,05 p. 1.000 cm³.

Ayant commencé nos expériences sur des animaux soumis au régime rachitigène depuis six jours nous avons vu dès ce moment là : dans les fémurs et les tibias, des cartilages de conjugaison larges et mous ; de plus l'ensemble de l'os est peu résistant et très irrigué. Vers le treizième jour les cartilages sont encore mous et *très larges*. Aux environs du seizième jour ils deviennent peu distincts. Vers le vingt-deuxième jour du régime ils sont durs, étroits et calcifiés ; la « guérison spontanée » du rachitisme s'est alors opérée.

Voici l'ensemble des résultats obtenus au cours du rachitisme et chez des animaux normaux témoins de même poids.

TABLEAU III.

Activité relative de la phosphatase des omoplates, voûte crânienne et incisives chez les Rats normaux (animaux témoins des tableaux suivants).

Poids des animaux (g.)	Activité phosphatasique relative de		
	Voûte crânienne	Omoplate	Incisives
25	39	54	61
32	44	47	49
32	56	61	61
40	34	40	32
42	36	30	36
50	29	36	30
58	24	47	42
60	31	21	30
82	21	19	33
96	16	40	21

TABLEAU IV.

Activité phosphatasique relative des diverses portions du tibia et du fémur chez le Rat normal aux périodes successives du développement. (Tableau emprunté à J. ROCHE et A. LÉANDRI).

Poids de l'animal (g.)	Activité phosphatasique relative du					
	Fémur			Tibia		
	Epiphyse superieure	Epiphyse inférieure	Dia- physe	Epiphyse supérieure	Epiphyse inférieure	Dia- physe
6	57	32	60	57	58	92
6	85	74	102	83	98	106
8	62	66	201	86	73	104
11	62	66	185	57	86	140
12	40	68	104	—	67	53
16	73	59	124	81	76	129
22	73	81	137	69	99	132
25	80	35	142	33	118	80
27	84	34	83	42	48	96
34	48	41	77	49	57	78
41	37	51	66	34	50	62
45	50	63	59	47	49	57
51	21	22	40	23	27	37
53	23	11	42	22	17	25
65	10	15	12	12	22	25
65	19	27	24	12	25	28
75	20	16	21	13	17	24
87	13	10	16	13	12	18
100	10	15	12	6	11	10
102	12	15	30	13	40	26
105	13	8	15	10	—	12
120	8	7	10	8	10	10
147	9	12	13	7	10	14
157	12	9	12	10	11	14
157	9	7	12	9	11	8
160	13	7	10	11	11	11
162	11	16	16	—	10	16

TABEAU V.

Activité phosphatase relative des diverses portions du tibia et du fémur chez le Rat au cours du rachitisme.

Poids initial du Rat (g.)	Poids final du Rat (g.)	Nombre de jours de régime	Activité phosphatase relative du					
			Tibia			Fémur		
			Epiphyse supérieure	Diaphyse	Epiphyse inférieure	Epiphyse supérieure	Diaphyse	Epiphyse inférieure
Poids compris entre 25 g. et 30 g.	33	10	184	184	183	224	406	125
	39	10	81	162	71	92	408	74
	47	14	56	50	50	119	48	42
	59	20	36	81	52	61	53	29
	52	22	42	50	42	22	42	23
	85	36	48	38	30	15	36	15
	97	38	20	55	51	25	11	42

TABEAU VI.

Activité phosphatasique relative des diverses portions du tibia et du fémur chez le Rat au cours du rachitisme.

Poids initial du Rat (g.)	Poids final du Rat (g.)	Nombre de jours du régime	Activité phosphatasique relative du					
			Tibia			Fémur		
			Epiphyse supérieure	Diaphyse	Epiphyse inférieure	Epiphyse supérieure	Diaphyse	Epiphyse inférieure
30	44	10				34	92	25
35	43	12	65	105	70	134	163	78
45	55	13	50	50	23	42	47	16
45	50	17	54	66	77	26	96	40
52	65	18	54	67	116	87	95	44
55	70	19	45	55	31	57	104	29
54	61	20	32	64	35	30	78	32
74	74	24	40	75	52	20	40	33
45	73	25	49	74	49	60	47	20
60	78	26	66	45	68	15	21	13
80	82	27	13	38	47	30	46	17

TABLEAU VII.
*Activité phosphatase relative des diverses portions du tibia et
 du fémur chez le Rat au cours du rachitisme.*

Poids initial du Rat (g.)	Poids final du Rat (g.)	Nombre de jours du régime	Activité phosphatase relative du					
			Tibia			Fémur		
			Epiphyse supérieure	Diaphyse	Epiphyse inférieure	Epiphyse supérieure	Diaphyse	Epiphyse inférieure
29	26	6	65	196	70	51	—	76
24	20	8	40	151	73	93	116	105
27	30	13	58	75	94	51	165	37
28	23	15	67	192	72	114	275	47
35	38	16	62	120	69	136	217	56
30	34	20	35	140	33	82	37	21
30	40	22	79	118	78	59	103	35
26	35	27	23	36	27	25	21	18
31	55	28	31	40	26	19	75	25

TABLEAU VIII.

Parallèle entre l'activité phosphatase des os longs de Rats rachitiques (T), et l'activité phosphatase des os longs de Rats rachitiques en présence de l'ion activateur Mg^{++} . Les animaux des deux lots, de poids analogue, sont soumis au même régime pendant le même temps.

	Poids initial du Rat (g.)	Poids final du Rat (g.)	Nombre de jours du régime	Activité phosphatase relative du					
				Tibia			Fémur		
				Epiphyse supérieure	Diaphyse	Epiphyse inférieure	Epiphyse supérieure	Diaphyse	Epiphyse inférieure
Mg^{++} de Mg^{++} T = témoin sans									
T	27	30	23	58	75	94	54	165	37
Mg^{++}	28	30	13	81	105	87	370	150	76
T	30	40	22	79	118	78	59	103	35
Mg^{++}	31	40	22	56	61	113	162	178	21
T	26	35	26	23	36	27	25	21	18
Mg^{++}	30	30	26	43	81	118	45	63	29

TABLEAU IX.

Activité phosphatasique relative des os plats chez le Rat, au cours du rachitisme.

Poids initial du Rat (g.)	Poids final du Rat (g.)	Nombre de jours de régime	Activité phosphatasique relative de		
			Omoplate	Voûte cranienne	Incisives
Poids compris entre 25 g. et 30 g.	30	7	148	105	133
	32	7	180	100	131
	33	10	107	100	84
	39	10	55	149	90
	47	14	59	75	134
	59	20	33	43	39
	52	22	79	47	50
	85	36	37	59	53
	97	38	52	56	65

TABLEAU X.

Activité phosphatasique relative des os plats chez le Rat, au cours du rachitisme.

Poids initial du Rat (g.)	Poids final du Rat (g.)	Nombre de jours de régime	Activité phosphatasique relative de		
			Omoplate	Voûte cranienne	Incisiées
30	44	10	148	95	38
35	43	12	148	221	103
45	50	17	104	53	30
52	65	18	125	80	72
55	70	19	71	41	58
54	61	20	77	48	73
74	74	24	85	31	75
45	73	25	48	37	60
60	78	26	68	45	67
80	82	27	43	57	42

TABLEAU XI.

Activité phosphatasique relative des os plats chez le Rat au cours du rachitisme.

Poids initial du Rat (g.)	Poids final du Rat (g.)	Nombre de jours de régime	Activité phosphatasique relative		
			Omoplate	Voûte craniennne	Incisives
29	26	6	115	44	54
24	20	8	45	70	66
27	30	13	175	150	132
28	23	15	211	79	78
35	38	16	152	104	122
30	34	20	124	91	128
30	40	22	126	68	114
26	35	27	103	31	77
31	55	28	31	32	49

TABLEAU XII.

Parallèle entre l'activité phosphatasique des os plats de Rats rachitiques T, et, l'activité phosphatasique des os plats de Rats rachitiques en présence de l'ion activateur Mg^{++} . Les animaux des deux lots sont de poids analogue et ont été soumis au même régime pendant le même temps.

T Mg^{++} en présence de Mg^{++}	Poids initial du Rat (g.)	Poids final du Rat (g.)	Nombre de jours de régime	Activité phosphatasique relative		
				Omoplate	Voûte craniennne	Incisives
T	27	30	13	175	150	132
Mg^{++}	28	30	13	181	155	155
T	30	40	22	126	68	114
Mg^{++}	31	40	22	115	69	117
T	26	35	26	103	31	77
Mg^{++}	30	30	26	213	89	50

Plus les animaux soumis au régime rachitigène de RANDOIN et LECOQ sont de faible poids, plus l'activité enzymatique est accrue au début de l'expérience.

Ces faits sont à rapprocher de ceux observés par A. ROCHE et I. GARCIA [82] au cours de leur étude de l'évolution du rachitisme expérimental chez le Rat en croissance. En effet lorsqu'un animal de 20 à 30 grammes est soumis au régime de RANDOIN-LECOQ il présente rapidement des lésions du type rachitique dans les cartilages de conjugaison de ses os longs. Puis ces lésions s'aggravent et atteignent leur gravité maxima du douzième au quinzième jour d'expérience ; par la suite les animaux continuent à se développer, leur os se calcifient et paraissent guéris spontanément, bien que leur degré de calcification demeure toujours inférieur à celui des témoins. Le rachitisme expérimental évolue donc en deux phases, à savoir : l'organisation des lésions chez des animaux très jeunes (de 20 à 50 grammes) et la calcification des os rachitiques quand le premier stade de la croissance est dépassé (vers 80 à 100 g). L'augmentation de la teneur en phosphatase correspond seulement à la première de ces phases.

VI. — Discussion des résultats.

Examen d'ensemble des résultats.

Notre but est de savoir si le rachitisme peut avoir pour origine une déficience du mécanisme d'enrichissement local en ions PO_4^- . Les valeurs de l'activité enzymatique dans le cas pathologique qui nous intéresse, n'ont une pleine signification que si elles sont comparées à l'activité de la phosphatase des os d'animaux normaux et de même poids. Afin d'avoir une claire expression des résultats obtenus, nous avons tracé les courbes ci-dessous mettant en parallèle l'activité phosphatase des os rachitiques et celle des os normaux.

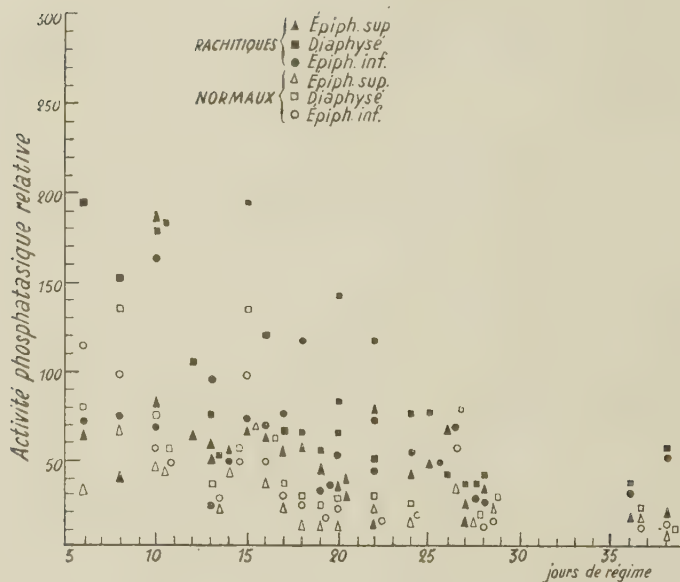


FIGURE 3. — Activité phosphatasique relative des TIBIAS de Rats normaux ou rachitiques de même poids.

Abscisses : jours de régime rachitigène. Ordonnées : Activité enzymatique.

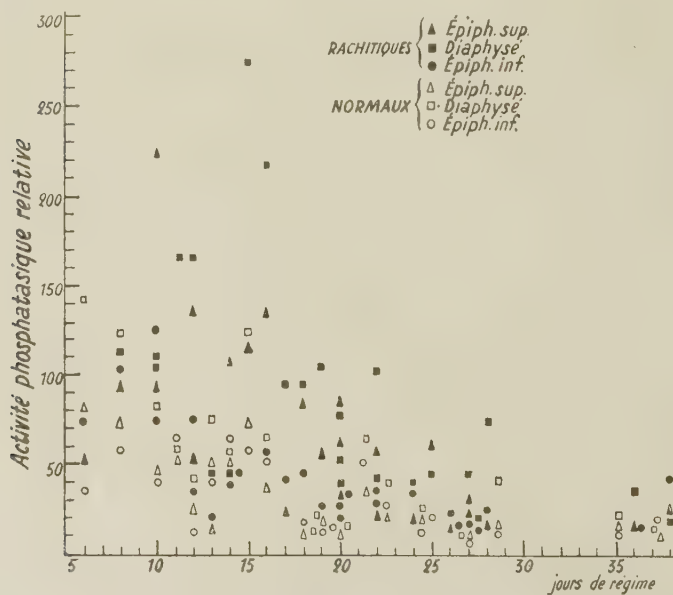


FIGURE 4. — Activité phosphatasique relative des FÉMURS de Rats normaux ou rachitiques de même poids.

Abscisses : jours de régime rachitigène. Ordonnées : Activité enzymatique.

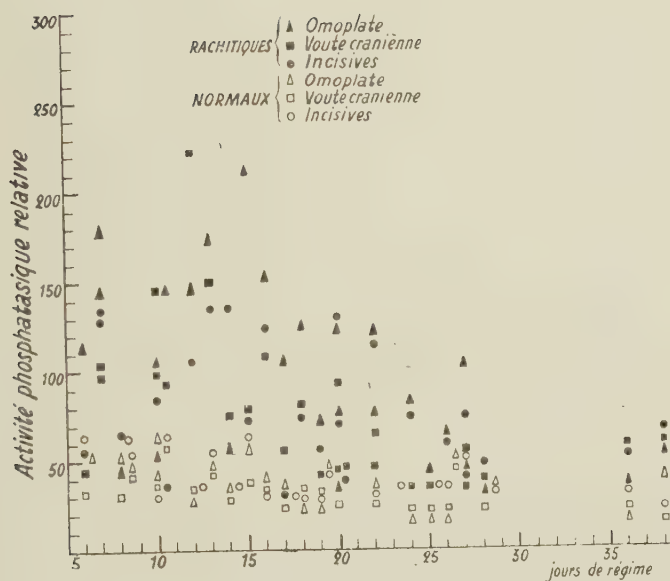


FIGURE 5. — Activité phosphatasique relative des OMOPLATES, VOUTES CRANIENNES et INCISIVES de Rats normaux ou rachitique de même poids.

Abscisses : jours de régime rachitigène. Ordonnées : Activité enzymatique.

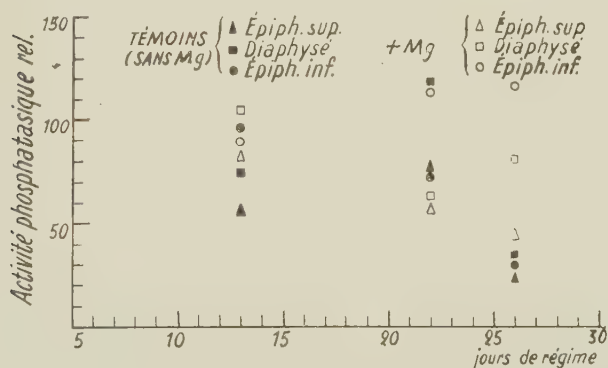


FIGURE 6. — Activité phosphatasique relative de TIBIAS de Rats rachitiques en la présence ou en l'absence de Mg^{++} .

Abscisses : jours de régime rachitigène. Ordonnées : Activité enzymatique.

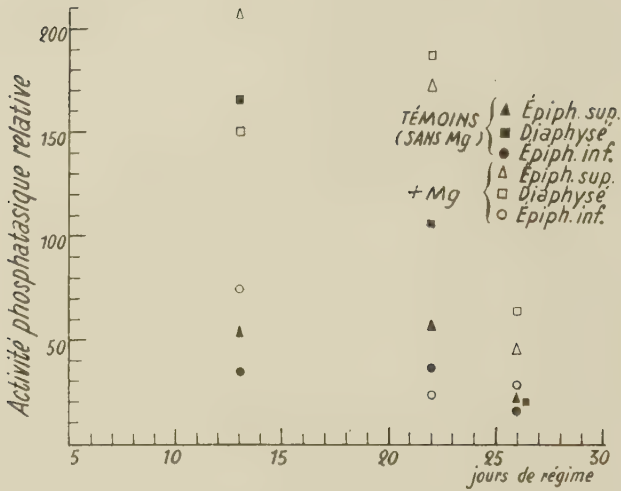


FIGURE 7. — Activité phosphatasique relative des FÉMURS de Rats rachitiques en la présence ou en l'absence de Mg^{++} .
Abscisses : jours de régime rachitigène. Ordonnées : Activité enzymatique.

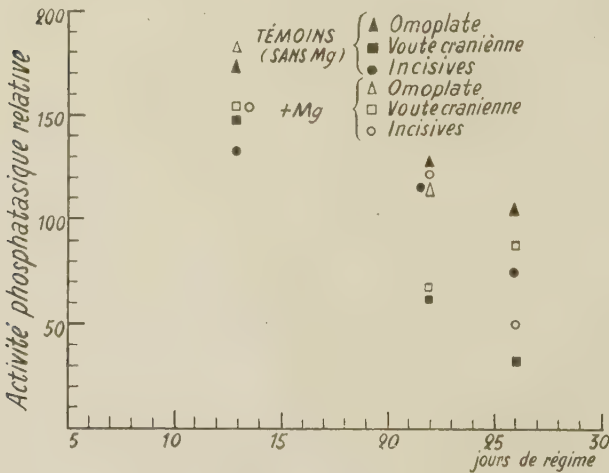


FIGURE 8. — Activité phosphatasique relative des OMOPLATES, VOUTES CRÂNIENNES et INCISIVES de Rats rachitiques en la présence ou en l'absence de Mg^{++} .
Abscisses : jours de régime rachitigène. Ordonnées : Activité enzymatique.

Ces figures permettent de faire deux groupes de déductions relatives à : 1° l'étude de l'activité phosphatasique des os au cours du rachitisme expérimental ; 2° l'étude de cette activité enzymatique en présence d'ion magnésium.

ACTIVITÉ PHOSPHATASIQUE DES OS AU COURS DU RACHITISME EXPÉRIMENTAL.

Examinons tout d'abord les figures III et IV. *L'activité phosphatasique dans les différentes parties des os longs (épiphyse supérieure, diaphyse, épiphyse inférieure) est plus grande chez les animaux rachitiques que chez les Rats normaux de même poids, durant une période allant approximativement du sixième au vingtième jour d'expérience. L'activité de la phosphatase décroît ensuite et se rapproche de celle des os normaux jusqu'à la fin de nos expériences.*

Un parallèle avec les remarques déjà notées au sujet de l'aspect du cartilage de conjugaison lors de la dissection des os a été résumé dans le tableau suivant (Tableau XIII).

TABLEAU XIII.

Nombre de jours de régime	Aspect du cartilage de conjugaison	Activités phosphatasiques
Du 6 ^e au 12 ^e jour environ	larges et mous	Grande activité phosphatasique
Du 12 ^e au 17 ^e jour environ	très larges et mous	Grande activité phosphatasique
Du 17 ^e au 22 ^e jour environ	peu nets, en voie de calcification	Diminution de l'activité phosphatasique
Au 22 ^e jour environ..	ossifiés	Activité phosphatasique normale

D'après ce tableau nous voyons très nettement que l'activité phosphatasique varie en raison inverse du durcissement du cartilage de conjugaison dans les os rachitiques, c'est-à-

dire que l'activité du mécanisme d'enrichissement local en ions $\text{PO}_4^{=}$ est très augmentée alors qu'aucun dépôt calcaire ne se produit, constatation qui peut être rapprochée de celles faites par J. ROCHE et A. FILIPPI [88], dans le cas de fracture osseuse. Les os fracturés sont riches en phosphatase surtout avant que les processus de calcification du cal n'aient pris une grande intensité.

Ce sont là des faits observés dans des cas pathologiques, mais il est à remarquer aussi, dans le même ordre d'idée, que dans un organisme normal en croissance, c'est seulement au stade du développement où l'augmentation de la teneur des os en sels est la plus rapide que la teneur en phosphatase est la plus élevée. Toutes ces données concordent pour prouver que, comme l'avait déjà pressenti ROBISON [75], il existe sans doute des processus d'ossification autres que ceux auxquels participe cet enzyme.

Tout le système osseux est affecté dans le rachitisme, l'augmentation, puis la diminution de la teneur en phosphatase se manifestent parallèlement dans tous les os, os longs pourvus de cartilage de conjugaison, os plats d'origine membraneuse ou cartilagineuse. L'activité phosphatasique des uns et des autres redevient normale lors de la « guérison spontanée ».

ACTIVITÉ PHOSPHATASIQUE EN PRÉSENCE D'IONS Mg^{++} DANS LES OS DES RACHITIQUES.

Il se peut que l'intensité de l'activité de la phosphatase dans les os soit due aux variations de la proportion d'activateurs et d'inhibiteurs spécifiques parmi lesquels les sels de magnésium et divers acides aminés jouent un rôle physiologique important (ERDTMANN [19] et BODANSKY [1]). A la suite des recherches de ROCHE, LÉANDRI et FILIPPI [89], de ROCHE et BULLINGER [87] on peut dire que l'enzyme des os est à un degré d'activation presque maximum du début de la croissance ; puis cette activité décroît, surtout en raison de l'appauvrissement du milieu en coenzyme. La diminution de l'activité phosphatasique est soumise à un moindre degré, aux variations

de production de l'enzyme par le tissu osseux (SCOZ et MARANGONI [100]).

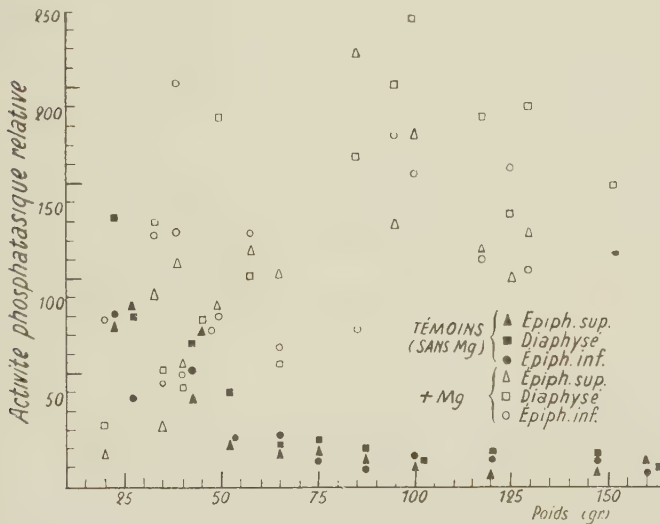


FIGURE 9. — Activité phosphatasique relative des FÉMURS de Rats normaux de poids divers en la présence ou en l'absence de Mg^{++} (d'après J. ROCHE, A. FILIPPI et A. LÉANDRI).

Abscisses : Poids corporel (grammes). Ordonnées : Activité phosphatasique relative.

La figure IX obtenue d'après les résultats de ROCHE, FILIPPI et LÉANDRI, montre clairement ce que nous venons de signaler : l'action activatrice de l'ion Mg^{++} sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate de sodium est faible au début de la croissance, mais très marquée dans les os d'animaux adultes qui ne sont donc pas dépourvus de phosphatase, mais pauvres en activateurs. Elle permet d'interpréter les figures VI et VII que nous avons établies à l'aide de données obtenues sur le Rat rachitique. Après le même nombre de jours de régime, nous avons sacrifié trois Rats rachitiques de poids analogue, et nous avons dosé l'activité enzymatique des os de l'un d'eux en la présence d'ion Mg^{++} . Nos expériences portant sur les os longs, les os plats et les dents ont donné des résultats exposés dans les tableaux VIII et XII.

En examinant les figures VI et VII nous pouvons conclure que l'ion Mg^{++} augmente relativement peu le pouvoir phospha-

lasique des os des jeunes Rats rachitiques. Les points obtenus sont dans l'ensemble, du même ordre de grandeur. Et la figure IX montre bien quelle peut-être dans certains cas la puissance activatrice des sels de magnésium. La figure VIII relative aux os plats et aux dents est encore plus suggestive que les précédentes.

Donc aussi bien dans les os longs que dans les os plats et les dents, l'activité du système phosphatasique est voisine du maximum chez les rachitiques ; les os sont alors très riches en activateurs.

VII. — Conclusions.

L'étude des variations de l'activité phosphatasique au cours du rachitisme expérimental, poursuivie dès les premiers jours de la maladie jusqu'au stade de guérison spontanée, nous permet de conclure ainsi :

1° La teneur en phosphatase est plus élevée dans les os de l'ensemble du squelette (os longs, os plats, dents) chez les animaux rachitiques que chez les animaux normaux de même poids. Donc les dystrophies osseuses observées chez les rachitiques n'ont pas pour origine une déficience du système phosphatasique. La cause du défaut de calcification de la matrice protéique existant dans le rachitisme doit être recherchée dans un autre des facteurs participant à l'ossification.

2° L'activité enzymatique des os d'animaux rachitiques de 30 à 40 grammes, n'est pas susceptible d'être beaucoup augmentée par l'ion Mg^{++} , ce qui nous permet de dire que dans les organes osseux de ces Rats l'enzyme présente son activité maxima, probablement en raison de la richesse en coenzyme du squelette, comme tel est aussi le cas dans les os des Rats normaux en croissance.

SECONDE PARTIE.

Affinité de la matrice préosseuse pour les ions phosphorique et calcium dans le rachitisme expérimental.

Ayant constaté dans nos expériences précédentes que la formation des lésions rachitiques ne mettait pas en cause le mécanisme phosphatasique, nous avons orienté notre attention non plus vers l'*apport* des matériaux nécessaires à la calcification, mais vers la *fixation* de ceux-ci par la matrice préosseuse. Ces deux processus sont indépendants l'un de l'autre ; ce sont deux phases, deux étapes de l'ossification, contrairement à ce que pensait ROBISON [75]. Cet auteur envisageait un mécanisme phosphatasique ou premier mécanisme et un second mécanisme de celle-ci, comportant la fixation des sels sur la matrice protéique de l'os. Or il existe un mécanisme d'apport minéral à la substance osseuse et, indépendamment de celui-ci, on trouve au niveau de la substance préosseuse une protéine particulière qui permet la fixation du sel de l'os. On peut dès lors se demander si les dystrophies osseuses du rachitisme ne sont pas dues, en partie tout au moins, à une réduction de l'affinité de l'os pour les sels minéraux, qu'il fixe normalement en abondance.

Les événements actuels ne nous ont pas permis d'obtenir à cet égard de nombreux résultats. Mais nous n'en n'avons pas moins cru devoir indiquer ici les essais auxquels nous nous sommes livrés, car ils constituent un point de départ pour les recherches que nous aurions désiré poursuivre. Nous examinerons successivement : les travaux antérieurs aux nôtres sur ce sujet, la méthode d'étude à laquelle nous nous

sommes arrêtés, et enfin les résultats obtenus sur des os d'animaux normaux en croissance servant de témoins, puis sur les animaux rachitiques.

I. — Calcification *in vitro*.

ROBISON [75] et ses collaborateurs, ont fait depuis 1925 des expériences de calcification *in vitro* afin d'étudier particulièrement le rôle des esters phosphoriques dans l'ossification. Ils montrèrent sans l'expliquer l'importance de la matrice préosseuse dans la fixation du sel de l'os, ils ne donnèrent pas de résultats quantitatifs. Par ailleurs LOGAN et TAYLOR [45, 46, 47], plus récemment (1935, 1937, 1938), étudièrent la solubilité du sel de l'os *in vitro*. Ils ont apporté des résultats qui, bien que n'ayant pas directement trait à la formation de l'os *in vitro*, n'en ont pas moins pour nous un grand intérêt. Toutes ces expériences éclaircissent en effet progressivement certains points du problème posé.

« Le fait que les os des animaux rachitiques ne manquent pas de phosphatase me conduisit, dit ROBISON, à essayer si la calcification pouvait se faire en immergeant ces os *in vitro* dans des solutions d'hexosemonophosphate de calcium ou d'autres esters phosphoriques hydrolysables ». ROBISON conduisit des expériences en collaboration avec Miss SOAMES et GOLDBLATT [31] puis avec la collaboration histologique de Miss FELL [20]. L'expérimentation était la suivante : des cartilages costaux ou des coupes d'épiphyes de tibias de Rats rachitiques étaient immergés durant 16 heures à 37° dans une solution d'hexosemonophosphate de calcium ou de glycérophosphate de calcium. L'os homologue plongé dans une solution de phosphate de sodium ou de chlorure de sodium servait de témoin, le milieu étant dans les deux cas saturé de chloroforme. On observait en général que la zone du cartilage hypertrophié se calcifiait, tandis que les petites cellules du cartilage épiphysaire ne présentaient aucun dépôt calcaïque. La calcification *in vitro*, se fait exactement où elle aurait eu lieu *in vivo* chez un animal normal. Mais, dans ce cas, les conditions sont tout à fait différentes de celles rencontrées dans l'organisme vivant ; la solution est très concentrée en calcium et ne contient pas de phosphates inorganiques tant

que la phosphatase n'a pas hydrolysé l'ester phosphorique.

SHIPLEY [104] en 1924, puis en 1926, SHIFLEY, KRAMER et HOWLAND [104] immergèrent des os de Rats rachitiques, le premier dans du sérum de Rats normaux, le second dans une solution stérile de sels inorganiques (ClNa , SO_4Mg , CO_3NaH) contenant les ions Ca^{++} et PO_4^{--} en quantités identiques à celles existant dans le plasma, soit 10 mg. de calcium pour 100 cm^3 et 4 mg. de phosphore pour 100 cm^3 . La calcification s'opère alors « normalement » en 9 heures environ. Ces auteurs concluent de l'examen histologique des coupes d'os que : « dans l'ossification *in vitro* des os rachitiques comme dans le rachitisme humain, le premier fait que l'on observe est la formation d'une ligne de calcification dans le cartilage proliférant ; la calcification ne se manifeste pas uniformément dans une zone, mais dans de petites aires séparées les unes des autres, par du cartilage non calcifié qui s'ossifient progressivement... ». Il s'agit donc de la reproduction *in vitro* d'un processus physiologique. Par ailleurs le phosphate tricalcique se dépose dans une matrice intercellulaire de substance osseuse et non dans le cytoplasme cellulaire.

ROBISON et SOAMES en 1928 et 1930, virent que la calcification s'effectuait à des concentrations en ions calcium et phosphoriques plus faibles en présence d'un ester phosphorique qu'en l'absence de celui-ci. Dans ce cas, le produit minimum $[\text{Ca}] \times [\text{P}]$ requis pour obtenir la précipitation est plus bas. 0,5 mg. P pour 100 cm^3 , sous la forme d'ester phosphorique (taux de cet ester dans le plasma) peuvent déterminer la précipitation de phosphate tricalcique quand le milieu contient Ca^{++} . Plus le taux des esters est élevé plus la précipitation augmente. Pendant l'expérience, il se produit une légère augmentation de la concentration du phosphate inorganique dans le liquide où l'os est immergé, mais elle dépasse rarement 0,5 mg. pour 100 cm^3 et n'apparaît que vers la fin de la période d'immersion.

Différents auteurs ont étudié l'influence de plusieurs facteurs sur la calcification *in vitro*. SHIPLEY [104], HOLT [36] en 1927, KRAMER [36], SHELLING et ORENT, à la même époque, ont établi que le chlorure de sodium, le chlorure de potassium et le chlorure de magnésium sont des inhibiteurs de la calcification. Dans le cas où ces corps sont présents, la valeur du produit $[\text{Ca}] \times [\text{P}]$ requise pour obtenir la précipitation est

plus grande. L'acétone, l'alcool, le chloroforme ont peu ou pas d'effet sur la phosphatase. Le cyanure de potassium est faiblement inhibiteur en présence d'ester, mais le formol l'est fortement. Cependant dans une solution de sels inorganiques une concentration M/1000 de cyanure de potassium arrête la calcification. Ce fait montre que l'activité des cellules vivantes est nécessaire dans le processus d'ossification. D'autre part, la dessiccation du cartilage ou le traitement par les solvants des corps gras réduit son aptitude à se calcifier, mais ne touche pas le mécanisme phosphatasique.

MAC LEOD et ROSENHEIM [78] ont étudié l'action du bicarbonate de sodium sur la calcification. Lorsque le taux de bicarbonate de sodium atteint 0,2 pour 100 cm³, c'est-à-dire une concentration voisine de celle trouvée dans le sang, la calcification se fait régulièrement avec $[Ca] \times [P]$ plus bas, que pour des concentrations de l'ordre de 0,03 pour 100 cm³ utilisées dans les premières expériences. Il faut en conclure qu'un complexe carbonatophosphaté précipite et que sa solubilité est moindre que celle de $(PO_4)_2Ca_3$ qui se forme, en l'absence de bicarbonate. La précipitation séparée de carbonate de calcium paraît exclue, car aucun dépôt ne se fait en l'absence de phosphate, même avec de fortes concentrations de calcium.

Au point de vue du pH la calcification *in vitro* se fait entre pH = 6,5 et 8. Dans les solutions acides, les quantités de calcium et de phosphate utiles pour obtenir la précipitation sont plus grandes que dans les solutions alcalines, et les résultats les meilleurs sont obtenus pour des pH voisins de celui du plasma, soit à pH = 7,4-7,2.

ROSENHEIM et ROBISON [78] ont étudié l'action des protéines du sérum, du glucose, et d'autres constituants organiques du sang, sur la calcification *in vitro*. Si l'on ajoute 7 p. 100 de protéines du sérum à une solution saline, il faut pour obtenir alors une précipitation, augmenter les concentrations de phosphore et de calcium, car il se forme une combinaison protéine-calcium qui diminue la concentration des ions Ca^{++} dans la solution. Le glucose donnerait ainsi une combinaison : calcium-glucose qui diminue le calcium ionisé et a de ce fait une action inhibitrice sur la calcification.

Miss FELL [20] du « Strangeways Research Laboratory » de Cambridge a montré qu'un fémur d'embryon de Poulet de

8 jours, cultivé *in vitro* dans une solution calcifiante, continue un remarquable développement normal, tant histologique qu'anatomique. De plus (FELL et ROBISON 1929 [20]) au moment de la transplantation, les cartilages de cet os ne possèdent pas d'activité phosphatasique mesurable, mais après trois jours *in vitro*, cette activité enzymatique peut être mise en évidence et elle s'accroît progressivement. Ceci est observé seulement où des cellules hypertrophiques se forment dans des cartilages qui s'ossifient normalement. A la suite de ces expériences, ROBISON [75] conclut : « Cette grande augmentation de dépôt de sels de calcium, et la délimitation nette de la zone de calcification des transplants après traitement par des solutions calcifiantes, semble indiquer que la capacité de poursuivre la calcification est une propriété spéciale associée à un stade défini du développement de la substance intracellulaire ».

On peut espérer mettre à profit la calcification des os *in vitro* pour préciser la nature de la combinaison phosphocalcique prenant naissance primitivement dans la minéralisation du squelette. D'après de nombreuses expériences le précipité qui se forme dans des mélanges salins *in vitro* semble être en première approximation $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$; mais des variations de composition ont été observées en fonction de la composition de la solution à partir de laquelle il se constitue (KLEMENT, GASSMANN). De plus lorsque le précipité demeure en contact avec le solvant, sa composition est altérée et le rapport : Ca/P augmente. Le précipité obtenu par l'union de $\text{PO}_4^=$ et Ca^{++} en solution légèrement acide peut être $\text{PO}_4 \text{CaH}$. Il se transforme lentement en $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$. Si CO_3NaH est présent dans la solution, on obtient un précipité de $3 (\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3 \cdot \text{CO}_3\text{Ca}$. La nature chimique du sel de l'os dépend de la marche de sa précipitation.

Le sel de l'os se forme-t-il par un mécanisme du même ordre, en une seule fois ou en plusieurs étapes ? Suivant cette seconde hypothèse, le précipité obtenu en premier lieu (soit $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$) adsorberait par la suite des ions supplémentaires tels que : Ca^{++} et $\text{CO}_3^=$, de la phase liquide. La concentration des ions Ca^{++} et $\text{PO}_4^=$ nécessaire pour former le sel de l'os, dépend du processus de précipitation.

LOGAN et TAYLOR [45] ont cherché pour quelles concentrations en ions calcium et en ions phosphorique le sel de l'os

précipite de la solution. Ils ont suivi les variations du produit de solubilité : $[Ca^{++}]^3 \times [PO_4^{=}]^2$. Selon les quantités plus ou moins grandes de sel de l'os ou de phosphate tricalcique, en équilibre *in vitro* avec une solution contenant les ions $PO_4^{=}$, $CO_3^{=}$ et Ca^{++} . LOGAN et TAYLOR [45] sont arrivés à cette conclusion. Le produit ionique $[Ca^{++}]^3 \times [PO_4^{=}]^2$ augmente tandis que la quantité d'os, ou de précipité $(PO_4)_2Ca_3$ en équilibre avec la phase liquide décroît au-dessous de 150 mg. par litre ». Si le sel de l'os consistait uniquement en des molécules formées par l'union simultanée des ions, le produit de solubilité du sel obtenu à partir des solutions sursaturées serait essentiellement le même, que peu ou beaucoup de phase solide se trouve en équilibre avec la phase liquide.

En général, les os des animaux jeunes ont une proportion de CO_3 à P plus petite que celle existant dans les os adultes (HUGOUNENQ 1900). Cet enrichissement progressif en carbonate peut être dû à des changements très lents, analogues à ceux observés dans les précipités à long équilibre. LOGAN et TAYLOR [45] ont remarqué que la composition de tels précipités dépend de la teneur de la phase liquide en ions Ca^{++} et en anions $CO_3^{=}$ et $PO_4^{=}$ qui peuvent être adsorbés. Ces expériences montrent quelle est la complexité de l'étude du « sel de l'os » au point de vue de sa formation, de sa nature chimique et de son évolution. Mais ces données sont-elles applicables à la calcification rapide de coupes d'os ? Cela est probable en première approximation. Toutefois les processus de « remplacement » des ions $PO_4^{=}$ et $CO_3^{=}$ ou CO_3H^{-} signalés par LOGAN rendent à coup sûr difficile l'interprétation des faits observés.

Nous nous sommes proposés, en employant la méthode de calcification *in vitro*, d'essayer de voir quelles sont les quantités de phosphore et de calcium fixées par les cartilages de conjugaison et les os métaphysaires d'animaux normaux, et de faire le rapport des ions $PO_4^{=}$ et Ca^{++} enlevés à la solution par l'os.

Le « sel de l'os » pouvant être soit $(PO_4)_2Ca_3$, soit PO_4CaH , soit $3(PO_4)_2Ca_3 \cdot CO_3Ca$, les rapports du phosphore au calcium dans ces différents sels, sont respectivement :

$$\frac{6 \text{ P}}{10 \text{ Ca}} = 0,46 \text{ pour } 3 (\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3. \text{CO}_3\text{Ca}$$

$$\frac{2 \text{ P}}{3 \text{ Ca}} = 0,51 \text{ pour } (\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$$

$$\frac{\text{P}}{\text{Ca}} = 0,77 \text{ pour } \text{PO}_4 \text{ CaH.}$$

Notre premier but est de *comparer les rapports expérimentaux observés à ces rapports théoriques et d'en déduire si les ions PO_4^- et Ca^{++} fixés le sont en quantité correspondant à la formation de l'un ou de l'autre sel.*

Par ailleurs cette étude devait en outre permettre de *mesurer l'affinité d'un fragment osseux pour les ions calcium et phosphorique au contact desquels il est placé.* Il en découle que si on la poursuit parallèlement sur des os normaux et sur des os rachitiques on doit pouvoir répondre à la question suivante : posée depuis 1910 par LEHNERDT : Le rachitisme est-il une maladie au cours de laquelle les os présentent une réduction d'aptitude à fixer les sels phosphocalciques ? C'est là un problème important à résoudre et jusqu'ici les travaux qui lui ont été consacrés sont d'ordre qualitatif. Le plus important d'entre eux a été poursuivi par ROSENHEIM [78]. Il a porté sur l'ossification *in vitro*, de cartilage de conjugaison, d'os de Rats rachitiques soumis depuis des temps plus ou moins longs au régime provoquant la dystrophie. La conclusion est : « l'aptitude du cartilage à se calcifier diminue au fur et à mesure que l'on prolonge la période de régime rachitigène ». Il est difficile de ne pas accepter le fait que des modifications dans le pouvoir calcifiant du cartilage peuvent jouer un rôle dans le rachitisme. Nous nous sommes efforcés de préciser l'importance de ce rôle.

II. — Marche des expériences,

Nous avons divisé notre travail en trois parties :

1° Mise au point du dosage des ions Ca^{++} , sur une solution nutritive titrée, et ceci afin d'apprécier le degré de précision des mesures que nous nous proposons de faire.

2° A) Fixation des ions Ca^{++} et PO_4^- par les cartilages de conjugaison et les os métaphysaires de fémurs de Veau im-

mergés dans une solution calcifiante. Ces essais devaient permettre une standardisation de notre méthode de mesure de l'affinité de l'os pour les ions.

B) Fixation des ions $\text{PO}_4^{=}$ et Ca^{++} par des cartilages de conjugaison des os de jeunes Rats normaux.

3° Fixation de ces ions par des cartilages de Rats rachitiques.

A. — DOSAGE DU CALCIUM DANS LES MILIEUX NUTRITIFS.

Nous avons employé une méthode très voisine de celle, classique, de KRAMER et TISDALL. En voici la description.

Le principe du dosage est le suivant : on précipite le calcium à l'état d'oxalate ; on recueille le précipité, on le dissout dans de l'acide sulfurique à chaud, et on titre l'acide oxalique libéré, par le permanganate de potassium.

Nous avons préparé une solution titrant : 2 mg. de calcium par cm^3 à partir de CO_3Ca qui, en milieu chlorhydrique, se transforme en chlorure de calcium, soluble. Devant doser des quantités de calcium extrêmement faibles, nous avons dilué la solution initiale au cinquantième, en sorte que 1 cm^3 de solution contient 0 mg.,04 de calcium et dans un autre groupe d'expériences la solution a été diluée au 1/100, 1 cm^3 contenant alors 0,02 mg. de calcium.

Le mode opératoire du dosage est le suivant : 8 cm^3 de liquide, soit 0 mg.,02 de calcium sont prélevés, 2 cm^3 de solution tampon acéto-acétique sont ajoutés pour ajuster le pH entre 4 et 5,5, afin d'avoir une bonne précipitation de l'oxalate de calcium, que l'on obtient par addition d'1 cm^3 de solution saturée d'oxalate d'ammonium. Agiter, puis laisser reposer pendant 12 heures, laver le précipité par centrifugation plusieurs fois avec une solution saturée à froid d'oxalate de calcium ; ajouter 2 cm^3 d'acide sulfurique N. Faire dissoudre le précipité au bain-marie. Diluer à 5 ou 6 cm^3 , tiédir et titrer avec une solution 0,01 N de MnO_4K fraîchement préparée à l'aide d'une microburette.

Nous avons réuni dans les tableaux suivants les résultats des différents essais que nous avons faits, afin que l'on puisse se rendre compte de la précision obtenue.

TABLEAU XIV.

*Dosages de Ca^{++} sur une solution titrée à 0,04 mg. Ca par cm^3 .
Quantité mise en expérience : $8 \text{ cm}^3 = 0,32 \text{ mg. Ca.}$*

0,33	0,314	0,306	0,326	0,312
0,306	0,31	0,31	0,328	0,34
0,318	0,324	0,31	0,33	0,314
	0,316	0,304	0,324	0,328
Moyenne 0,318	0,307	0,322	0,32	0,325
Erreur $^0_0 - 0,06$	- 4,02	+ 0,06	- 0,00	+ 1,50

TABLEAU XV.

*Dosages de Ca^{++} sur une solution titrée à 0,02 mg. Ca par cm^3 .
Quantité mise en expérience : $8 \text{ cm}^3 = 0,16 \text{ mg. Ca.}$*

0,174	0,15	0,16	0,158	0,146
0,176	0,15	0,16	0,154	0,142
0,154	0,158	0,15	0,152	0,16
0,16	0,164	0,18		0,158
Moyenne 0,166	0,162	0,153	0,155	0,154
Erreur $^0_0 + 3,7$	+ 1,2	- 4,3	- 3,1	- 3,7

Nous pouvons appliquer ce dosage à nos recherches ultérieures, les résultats étant satisfaisants.

Nous avons employé pour doser les ions PO_4^{--} , la méthode de BRIGGS-ROBISON. Nous utilisons pour comparer les colorations obtenues dans nos essais à celles des témoins, le photomètre de PULFRICH et non un colorimètre ; la précision des résultats est en moyenne de deux à trois p. 100 sur des quantités de 20 à 70 γ P. Nous avons appliqué ces dosages à l'étude

de la fixation des ions PO_4^- et Ca^{++} par des fragments osseux : cartilages de conjugaison et os métaphysaires de fémurs de Veau et de cartilages de conjugaison de Rats.

B. — FIXATION *in vitro* DES IONS PO_4^- ET Ca^{++}
SUR DES FRAGMENTS OSSEUX.

1. — Préparation de la solution nutritive.

Nous avons vu que ROBISON [75] avait tout d'abord réalisé des calcifications *in vitro* dans des conditions très différentes de celles du milieu biologique. Plus tard des solutions et des sels inorganiques contenant les ions Ca^{++} et PO_4^- au même taux que le plasma, furent employées. Nous avons utilisé comme liquide de macération des fragments osseux, la solution de sels inorganiques de ROBISON dont voici la composition pour 100 cm^3 .

Chlorure de sodium	0,90	p. 100
Bicarbonate de sodium	0,03	p. 100
Chlorure de potassium	0,04	p. 100
Sulfate de magnésium cristallisé..	0,025	p. 100

A cette solution il faut ajouter 0,027 g. de chlorure de calcium qui donnent : 10 mg. de calcium p. 100 cm^3 et 2 $\text{cm}^3,42$ de la solution tampon de phosphate M/15 de SÖRENSEN de pH = 7,38 qui apportent 5 mg. de phosphore p. 100 cm^3 .

Il se forme de petites quantités de carbonate de calcium que l'on fait dissoudre en ajoutant environ 10 gouttes de ClH à 1 p. 100, le pH, alors un peu plus bas est voisin de 7. On le mesure à l'électrode de verre. La solution ainsi préparée est titrée en calcium et en phosphore suivant les méthodes indiquées plus haut.

2. — Marche des expériences et résultats obtenus.

Dans tous les cas nous avons expérimenté de la manière suivante : dans 10 cm^3 de solution, 50 ou 100 mg. d'os métaphysaire ou de cartilage de conjugaison soigneusement lavés dans du chlorure de sodium à 9 p. 1000 et éponges sont mis à macérer pendant 16 ou 18 heures à la température de 37° . Le milieu est saturé de chloroforme. Quelques fragments osseux immergés dans une solution isotonique de chlorure de sodium pur (9 p. 100) et mis à l'étuve pendant le même temps que les

essais. Ils serviront de témoins. Les tubes étant retirés de l'étuve, on décante le liquide, et on le déprotéinise par une solution d'acide trichloracétique à 8,5 p. 100. Le filtrat obtenu sert au dosage des ions $\text{PO}_4^=$ et Ca^{++} restants.

Les témoins ont dans tous les cas prouvé que, dans les conditions adoptées, la zone osseuse mise en expérience ne cédait pas de phosphore à la solution de chlorure de sodium, mais cédait du calcium en quantité dosable. Il s'en suit que nous avons dû tenir compte de ce dernier facteur, dans le calcul de la fixation des ions Ca^{++} .

Nous avons voulu voir toutefois, si le calcium était cédé en quantité analogue, d'une part à la solution de sels inorganiques de ROBISON (sans Ca^{++} ni $\text{PO}_4^=$), d'autre part à la solution isotonique de chlorure de sodium. Le tableau suivant résume nos essais :

TABLEAU XVI.

Parallèle entre la quantité de calcium libérée après macération pendant 16 h. à 37° par 100 mg. de cartilage de conjugaison ou d'os métaphysaire immergés soit :

dans 100 cm³ de la solution saline de ROBISON (sans P et sans Ca) soit :

dans 100 cm³ de la solution isotonique de chlorure de sodium.

Essai dans la solution de ROBISON		Témoins dans ClNa (g. p. 1000)
Cartilages de conjugaison {	<i>Premier essai :</i> 0,0293 mg.	0,0253 mg.
	— 0,0218 mg.	0,0202 mg.
	<i>Deuxième essai :</i> 0,0274 mg.	0,0272 mg.
		0,0257 mg.
Os métaphysaires..... {	<i>Premier essai :</i> 0,0350 mg.	0,0302 mg.
	— 0,0375 mg.	0,0314 mg.
	<i>Deuxième essai :</i> 0,0194 mg.	0,015 mg.
		0,024 mg.
Le premier-essai et le deuxième essai portent sur des fragments osseux d'animaux différents.		

Il ressort de l'ensemble de ces chiffres que les quantités de calcium libérées dans les deux solutions sont analogues. Nous avons dès lors appliqué à nos résultats le calcul dont voici un exemple : soit un fragment de cartilage pesant 90 mg. mis à macérer pendant 16 heures dans 15 cm³ d'une solution titrant : 0,053 mg. de phosphore par cm³ (A') et 0,115 mg. de calcium par cm³ (A).

Nous avons dosé le phosphore restant dans la solution après macération de l'os, soit 0,034 mg. (R'). La différence entre le taux de phosphore par cm³ de la solution avant et après macération de l'os (Q' = A' — R') correspond à la quantité fixée par le poids d'os mis en expérience, les pertes du fragment témoins étant nulles (T' = 0). La fixation de phosphore dans le cas envisagé est donc de 0,053-0,034 = 0,019 mg. P par cm³.

Nous avons dosé le calcium restant après macération (R), soit 0 mg.,87 Ca par cm³. Mais nos témoins ont prouvé que 100 mg. d'os dans 15 cm³ d'une solution de chlorure de sodium à 9 p. 100 avaient libéré en moyenne 0,037 mg. de calcium par cm³ ; l'os mis en expérience (pesant 90 mg.) a donc libéré dans la solution : 0,033 mg. de calcium par cm³ (T). La quantité de calcium devant rester en réalité dans la solution après macération est B = R-I, soit 0,087-0,033 = 0,054 mg. par cm³ ; donc, la fixation de calcium par cm³, par le poids d'os mis en expérience (90 mg.), est de : Q = A-B = 0,115-0,054 = 0,061 mg.. On peut donc établir le rapport suivant :

$$\frac{\text{Fixation de phosphore par cm}^3}{\text{Fixation de calcium par cm}^3} = \frac{0,019}{0,061} = 0,31$$

Ce calcul ne saurait être tenu pour rigoureux et cela pour plusieurs raisons. D'une part, deux fragments osseux identiques placés dans les mêmes conditions ne libèrent pas exactement la même quantités d'ions PO₄⁼ et Ca⁺⁺. D'autre part la mise en liberté des ions dépend du produit de solubilité [PO₄⁼]². [Ca⁺⁺]³ et il est certain que la composition du milieu où l'on fait macérer les fragments osseux intervient pour déterminer la valeur de celui-ci. Aussi ne peut-on considérer que les pertes en milieu dépourvu de ces ions, sont identiques à celles ayant lieu dans un milieu contenant ceux-ci ; il en résulte que nos témoins ont certainement une valeur trop élevée.

Nous avons néanmoins, faute de mieux, pris comme témoins les pertes en Ca^{++} et en $\text{PO}_4^{=}$ dans une solution isotonique de chlorure de sodium pensant qu'elles indiqueraient l'ordre de grandeur de celles ayant lieu aux faibles concentrations en calcium et en phosphate des milieux nutritifs. Cette imprécision est de nature à gêner nos recherches sur la composition du produit fixé au cours des expériences, mais elle ne doit pas *a priori* empêcher une mesure approchée de l'affinité de l'os pour le calcium et les phosphates. Ce qui rend difficile l'appréciation de celle-ci est qu'elle s'opère uniquement par la surface des coupes ; elle n'est donc pas proportionnelle au poids d'os mis en œuvre, mais à la surface de celui-ci. Nous avons néanmoins pensé qu'un premier essai pouvait être tenté en opérant suivant le mode indiqué, en employant des fragments osseux d'épaisseur aussi comparable que possible et dont la surface était peu variable d'une expérience à l'autre.

Les résultats de nos expériences sur les fémurs (cartilage de conjugaison et métaphyse) d'animaux différents ont été groupés en quatre tableaux, dans lesquels nous avons indiqué pour chaque essai la fixation de phosphate (Q') et de calcium (Q) par cm^3 (déterminée dans deux essais) et le rapport :

$$\frac{\text{phosphore fixé}}{\text{calcium fixé}} = \frac{Q'}{Q}$$

TABEAU XVII.

Fixation de $PO_4^{=}$ et Ca^{++} in vitro par les cartilages de conjugaison et la métaphyse de VEAUX normaux. Macération pendant 16 h. à 37° et à pH 7,1.

Solution de macération { $Ca = 0 \text{ mg.,}104 \text{ par cm}^3 \text{ (A)}$
 $P = 0 \text{ mg.,}060 \text{ par cm}^3 \text{ (A')}$

CARTILAGES DE CONJUGAISON

témoin dans une solution à 9. p. 1.000 de ClNa : 100 mg.
de cartilage libèrent dans 15 cm³

(T) $Ca = \left\{ \begin{array}{l} 1^{\text{er}} \text{ Essai : } 0,021 \text{ mg. Ca par cm}^3 \\ 2^{\text{e}} \text{ Essai : } 0,016 \text{ mg. Ca par cm}^3 \end{array} \right\}$ Moyenne : 0,0185 mg. Ca par cm³
(T') P = 0

Poids mg.	Fixation de $PO_4^{=}$ (mg. P p. cm ³) par le poids d'os mis en expérience	Fixation de Ca^{++} (mg. p. cm ³) par le poids d'os mis en expérience		Rapport P/Ca
		A' — R' = Q'	B = (R — T) A — B = Q	
C.1 : 60,5	0,06 — 0,054 = 0,006	0,103 — 0,011 = 0,092 ; 0,104 — 0,092 = 0,012		0,50
C.2 : 63	» — 0,051 = 0,009	0,091 — 0,011 = 0,080 ; » — 0,080 = 0,024		0,37
C.3 : 75	» — 0,055 = 0,005	0,100 — 0,014 = 0,086 ; » — 0,086 = 0,018		0,27
C.4 : 69,5	» — 0,054 = 0,006	0,090 — 0,013 = 0,082 ; » — 0,082 = 0,022		0,27

OS MÉTAPHYSAIRES.

Témoins dans une solution à 9 p. 1.000 de ClNa : 100 mg. de
métaphyse libèrent dans 15 cm³ :

(T) $Ca = \left\{ \begin{array}{l} 1^{\text{er}} \text{ Essai : } 0,020 \text{ mg. Ca par cm}^3 \\ 2^{\text{e}} \text{ Essai : } 0,017 \text{ mg. Ca par cm}^3 \end{array} \right\}$ Moyenne 0,0185 mg. Ca par cm³

	A' — R' = Q'	B = R — T A — B = Q		
M.1 : 91	0,06 — 0,044 = 0,016	0,089 — 0,016 = 0,073 ; 0,104 — 0,073 = 0,031		0,51
M.2 : 94	» — 0,058 = 0,002	0,099 — 0,017 = 0,082 ; » — 0,082 = 0,022		0,09
M.3 : 93	» — 0,056 = 0,004	0,1045 — 0,017 = 0,087 ; » — 0,087 = 0,017		0,23
M.4 : 85	» — 0,049 = 0,011	0,101 — 0,015 = 0,086 ; » — 0,086 = 0,018		0,61
M.5 : 85	» — 0,052 = 0,008	0,099 — 0,015 = 0,084 ; » — 0,084 = 0,020		0,40

TABLEAU XVIII.

Fixation de PO_4 et Ca^{++} in vitro, par les cartilages de conjugaison et la métaphyse de VEAUX normaux. Macération 16 h. à 37° et à $pH = 7,1$.

Solution de macération $\left\{ \begin{array}{l} Ca = 0 \text{ mg.,138 par cm}^3 \\ P = 0 \text{ mg.,05 par cm}^3 \end{array} \right.$

CARTILAGES DE CONJUGAISON.

Témoins dans une solution à 9 p. 1.000 de $ClNa$: 100 mg. de cartilage libèrent dans 15 cm^3

(T) $Ca = 0,042 \text{ mg. Ca p. cm}^3$

(T') $P = 0$

Poids mg.	Fixation $PO_4^{=}$ (mg. P p. cm^3) par le poids d'os mis en expérience	Fixation de Ca^{++} (mg. p. cm^3) par le poids d'os mis en expérience	Rapport P/Ca
	$A' - R' = Q'$	$B - (R - T) \quad A - B = Q$	
C.1 : 95	$0,05 - 0,045 = 0,005$	$0,130 - 0,040 = 0,090 ; 0,138 - 0,09 = 0,048$	0,10
C.2 : 85	» $0,036 = 0,014$	$0,136 - 0,035 = 0,101 ; \text{ » } - 0,101 = 0,037$	0,37
C.3 : 83	» $0,040 = 0,010$	$0,120 - 0,035 = 0,085 ; \text{ » } - 0,085 = 0,053$	0,10

OS MÉTAPHYSAIRES.

Témoins dans une solution à 9 p. 1.000 de $ClNa$: 10 mg. de métaphyse libèrent dans 15 cm^3 :

(T) $Ca = 0,041 \text{ mg. Ca par cm}^3$

(T') $P = 0$

	$A' - R' = Q'$	$D = R - T \quad A - B = Q$	
M.1 : 90	$0,05 - 0,042 = 0,008$	$0,156 - 0,037 = 0,119 ; 0,138 - 0,119 = 0,019$	0,42
M.2 : 91	» $- 0,040 = 0,010$	$0,147 - 0,034 = 0,113 ; \text{ » } - 0,113 = 0,025$	0,40
M.3 : 78	» $- 0,041 = 0,009$	$0,128 - 0,033 = 0,095 ; \text{ » } - 0,095 = 0,043$	0,20
M.4 : 82	» $- 0,042 = 0,008$	$0,146 - 0,033 = 0,113 ; \text{ » } - 0,113 = 0,025$	0,32

TABLEAU XIX.

Fixation du $PO_4^{=}$ et Ca^{++} in vitro, par les cartilages de conjugaison et la métaphyse de fémur de VEAUX normaux. Macération durant 16 h. à 37° à $pH = 7,0$.

Solution de macération $\left\{ \begin{array}{l} Ca = 0,115 \text{ mg. par cm}^3 \\ P = 0,053 \text{ mg. par cm}^3 \end{array} \right.$

CARTILAGES DE CONJUGAISON.

Témoins dans une solution à 9 p. 1000 de $ClNa$: 100 mm. de cartilage libèrent dans 15 cm^3 :

(T) $Ca = \left\{ \begin{array}{l} 1^{\text{er}} \text{ essai : } 0,034 \text{ mg. Ca par cm}^3 \\ 2^{\text{e}} \text{ essai : } 0,039 \text{ mg. Ca par cm}^3 \end{array} \right\}$ Moyenne : $0,0365 \text{ mg. Ca par cm}^3$
(T') $P = 0$

Poids mg.	Fixation $PO_4^{=}$ (mg. P p. cm^3) par le poids d'os mis en expérience	Fixation de Ca^{++} (mg. p. cm^3) par le poids d'os mis en expérience		Rapport P/Ca
		A' — R' = Q'	B = (R — T) A — B = Q	
C.1 : 90	0,053 — 0,034 = 0,019	0,087 — 0,033 = 0,054 ;	0,115 — 0,054 = 0,061	0,31
C.2 : 72	» 0,036 = 0,017	0,084 — 0,026 = 0,058 ;	» — 0,058 = 0,057	0,29
C.3 : 93	» 0,040 = 0,013	0,098 — 0,034 = 0,064 ;	» — 0,064 = 0,051	0,25

OS MÉTAPHYSAIRES.

Témoins dans une solution à 9 p. 1000 de $ClNa$: 100 mm. de cartilages libèrent dans 15 cm^3 :

(T') $Ca = \left\{ \begin{array}{l} 1^{\text{er}} \text{ essai : } 0,032 \text{ mg. Ca par cm}^3 \\ 2^{\text{e}} \text{ essai : } 0,033 \text{ mg. Ca par cm}^3 \end{array} \right\}$ Moyenne : $0,0315 \text{ mg. Ca par cm}^3$
(T') $P = 0$

	A' — R' = Q'	B = R — T	A — B = Q	
M.1 : 90	0,054 — 0,037 = 0,016	0,097 — 0,030 = 0,067 ;	0,015 — 0,067 = 0,048	0,33
M.2 : 95	» — 0,038 = 0,015	0,110 — 0,032 = 0,078 ;	» — 0,078 = 0,037	0,40
M.3 : 71	» — 0,035 = 0,018	0,100 — 0,024 = 0,076 ;	» — 0,076 = 0,039	0,46
M.4 : 89	» — 0,036 = 0,017	0,093 — 0,030 = 0,053 ;	» — 0,063 = 0,052	0,32

TABLEAU XX.

Fixation de PO_4 et Ca^{++} in vitro, par les catilages de conjugaison et la métaphyse de fémur de VEAUX normaux. Macération durant 16 h. à 37° et à $pH = 7,0$.

Solution de macération } $Ca = 0,100$ mg. par cm^3
 } $P = 0,06$ mg. par cm^3

CATILAGES DE CONJUGAISON.

Témoins dans une solution à 9 p. 1.000 de $ClNa$: 100 mg. de cartilage libèrent dans 15 cm^3 :

(1)

(T) $Ca = \begin{cases} 1^{er} \text{ essai : } 0,025 \text{ mg. Ca par cm}^3 \\ 2^{e} \text{ essai : } 0,025 \text{ mg. Ca par cm}^3 \end{cases}$

(T') $P = 0$

(2)

(T) $Ca = \begin{cases} 1^{er} \text{ essai : } 0,020 \text{ mg. Ca par cm}^3 \\ 2^{e} \text{ essai : } 0,023 \text{ mg. Ca par cm}^3 \end{cases} \quad \text{Moyenne : } 0,0215 \text{ mg. Ca par cm}^3$

(T') $P = 0$

Poids mg.	Fixation $PO_4^{=}$ (mg. P p. cm^3) par le poids d'os mis en expérience	Fixation de Ca^{++} (mg. p. cm^3) par le poids d'os mis en expérience		Rapport P/Ca
		$A' - R' = Q'$	$B = R - T \quad A - B = Q$	
			(1)	
C.1 : 58	0,06 — 0,051 = 0,009	0,097 — 0,014 = 0,083 ;	0,100 — 0,083 = 0,017	0,52
C.2 : 64	» — 0,052 = 0,008	0,092 — 0,016 = 0,076 ;	» — 0,076 = 0,024	0,33
C.3 : 49	» — 0,048 = 0,012	0,096 — 0,012 = 0,084 ;	» — 0,084 = 0,016	0,75
			(2)	
C.4 : 94	» — 0,034 = 0,026	0,089 — 0,020 = 0,069 ;	« — 0,069 = 0,031	0,83
C.5 : 59	» — 0,031 = 0,029	0,089 — 0,026 = 0,063 ;	» — 0,063 = ,037	0,78

OS MÉTAPHYSAIRES.

Témoins dans une solution à 9 p. 1.000 de $ClNa$: 100 mg. de cartilage libèrent dans 15 cm^3 :

(2)

(T) $Ca = \begin{cases} 1^{er} \text{ essai : } 0,028 \text{ mg. Ca par cm}^3 \\ 2^{e} \text{ essai : } 0,025 \text{ mg. Ca par cm}^3 \end{cases} \quad \text{Moyenne } 0,0265 \text{ mg. Ca par cm}^3$

(T') $P = 0$

	$A' - R' = Q'$	$B = R - T \quad A - B = Q$		
M. : 91	0,06 — 0,043 = 0,017	0,097 — 0,016 = 0,081 ;	0,100 — 0,081 = 0,019	0,89

(1) et (2) Expériences sur des fragments osseux d'animaux différents.

Après ces résultats acquis sur les fémurs de Veau, voici le tableau suivant qui est relatif aux résultats obtenus sur les os de Rats normaux. Six Rats dont les poids variaient de 37 à 60 grammes ont été sacrifiés. Les cartilages de conjugaison des fémurs et des tibias ont été prélevés et répartis en divers essais afin d'avoir dans chacun ou dans chaque témoin environ 50 mg. d'os. Les expériences sont conduites comme précédemment.

TABLEAU XXI.

Fixation in vitro de $PO_4^{=}$ et Ca^{++} par les cartilages de conjugaison de six RATS normaux pesant de 37 à 60 grammes. Macération durant 16 h. à 37° et à pH 7,0.

Solution de macération $\left\{ \begin{array}{l} Ca = 0,100 \text{ mg. par cm}^3 \text{ (A)} \\ P = 0,057 \text{ mg. par cm}^3 \end{array} \right.$

Témoins dans une solution de $ClNa$ à 9 p. 100 : 100 mm. de cartilage libèrent dans 15 cm^3 :

(T) $Ca : 0,030 \text{ mg. Ca par cm}^3$
(T') $P = 0$
(T) $Ca : 0,038 \text{ mg. Ca par cm}^3$
(T') $P = 0$

Poids mg.	Fixation $PO_4^{=}$ (mg. P p. cm^3) par le poids d'os mis en expérience	Fixation de Ca^{++} (mg. p. cm^3) par le poids d'os mis en expérience		Rapport P/Ca
	$A' - R' = Q'$	$B = R - T$	$A - B = Q$	
R. : 52	$0,057 - 0,044 = 0,013$	$0,100 - 0,015 = 0,085$; $0,100 - 0,085 = 0,015$		0,86
R. : 47	$0,057 - 0,050 = 0,007$	$0,104 - 0,017 = 0,087$; $0,100 - 0,087 = 0,013$		0,56

Voici enfin les résultats obtenus sur les cartilages de Rats rachitiques :

Six Rats pesant entre 30 et 60 grammes ont été soumis pendant dix jours au régime rachitigène de RANDOIN et LECOQ [74] et sacrifiés ; leurs cartilages de conjugaison (fémurs et tibias) sont répartis en deux séries d'essais afin d'avoir dans chacun 50 ou 60 mg. d'os. L'expérimentation conduite comme précédemment, nous a permis d'obtenir les résultats groupés dans le tableau suivant.

TABLEAU XXII.

Fixation in vitro de $PO_4^{\equiv}$ et Ca^{++} par les cartilages de conjugaison de six RATS rachitiques pesant entre 30 et 60 grammes. Macération durant 16 h. à 37°.

Solution de macération $\left\{ \begin{array}{l} Ca = 0,097 \text{ mg. par cm}^3 \\ P = 0,06 \text{ mg. par cm}^3 \end{array} \right.$

Témoins dans une solution de $ClNa$ à 9 p. 100 : 100 mm. de cartilage libèrent dans 15 cm^3 :

$Ca \left\{ \begin{array}{l} 1^{er} \text{ essai : } 0,041 \text{ mg. Ca par cm}^3 \\ 2^{e} \text{ essai : } 0,050 \text{ mg. Ca par cm}^3 \end{array} \right\}$ Moyenne : 0,0455 mg. Ca par cm^3
 $P = 0$

Poids mg.	Fixation $PO_4^{\equiv}$ (mg. P p. cm^3) par le poids d'os mis en expérience	Fixation de Ca^{++} (mg. p. cm^3) par le poids d'os mis en expérience		Rapport P/Ca
	$A' - R' = Q'$	$B = R - T$	$A - B = Q$	
R.1 : 67	0,06 — 0,057 = 0,003	0,151 — 0,030 = 0,121 ; 0,096 — 0,121 = nulle		»
R.1 : 54	0,06 — 0,062 = nulle	0,113 — 0,024 = 0,089 ; 0,097 — 0,089 = 0,008		»

C. — EXAMEN DES RÉSULTATS, DISCUSSION ET CONCLUSION.

a) *Fixation des ions $PO_4^{\equiv}$ et Ca^{++} par les cartilages de conjugaison et la métaphyse des fémurs de Veau.* — Examinons les tableaux XVII, XVIII, XIX, XX. Dans tous nos essais, il y a eu d'une part fixation de phosphate et d'autre part, fixation de calcium par le fragment osseux mis en expérience. Les rapports : P/Ca établis, comparés aux rapports théoriques des différents sels pouvant former le « Sel de l'os » présentent des valeurs très variables, non seulement d'un animal à l'autre, mais d'un fragment osseux à l'autre, prélevés cependant sur le même fémur. Ces différences observées sur diverses zones d'un même os, peuvent être dues à l'inégalité de leur degré de minéralisation ou à leur aptitude plus ou moins grande à se changer en sels de calcium. En outre, comme l'ont montré LOGAN et TAYLOR [45], le poids de l'os mis en expérience influe sur la valeur du résultat obtenu. Suivant les cas étudiés les rapports se rapprochent des valeurs théoriques de 0,51, de 0,38 ou de 0,77, caractéristiques des trois sels. Elles leur sont nettement inférieures ou supérieures dans certains essais. accusant ainsi dans le premier cas une plus grande fixation

de calcium par rapport au phosphore ; dans le second cas, une plus grande fixation de phosphore par rapport au calcium.

Ce fait semble indiquer que l'os ne fixe pas un phosphate de calcium préformé dans une solution nutritive, mais bien au contraire qu'il prélève les ions $\text{PO}_4^=$ et Ca^{++} dans celle-ci. C'est d'ailleurs à cette conclusion que sont parvenus J. ROCHE et MOURGUE dans une série de recherches sur les os embryonnaires actuellement en cours et dans lesquelles ils ont constaté qu'au cours des premières étapes de la calcification les os contiennent du phosphore et du calcium en proportion souvent fort éloignée de celle correspondant à $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$, à PO_4CaH ou aux apatites.

Il faut déduire de cet ensemble de données que le tissu qui s'ossifie ne semble pas fixer les ions $\text{PO}_4^=$ et Ca^{++} en proportions nettement définies, permettant par leur union simultanée de former soit du phosphate tricalcique, de la carbonato-apatite ou du phosphate bicalcique. Ce fait serait en accord avec les conclusions de LOGAN et TAYLOR [45] à la suite de leurs travaux consacrés à l'étude du sel de l'os.

b) *Fixation des ions $\text{PO}_4^=$ et Ca^{++} par les cartilages de conjugaison des os de jeunes Rats normaux.* — Les résultats exposés dans le tableau XXI permettent de penser que chez les animaux en croissance, les tissus en voie d'ossification fixent des ions $\text{PO}_4^=$ et Ca^{++} . Le petit nombre d'expériences faites à ce sujet ne nous permet pas une discussion très poussée. Cependant ces quelques résultats nous donnent la possibilité de faire la comparaison entre l'aptitude des cartilages de conjugaison normaux ou rachitiques à fixer les ions phosphorique calcium.

c) *Fixation des ions $\text{PO}_4^=$ et Ca^{++} par le cartilage de conjugaison d'os de Rats rachitiques.* — Les résultats contenus dans le tableau XXII prouvent que les cartilages de conjugaison n'ont pratiquement pas fixé les ions $\text{PO}_4^=$ et Ca^{++} dans les conditions où nous nous sommes placés. Ceci apparaît avec netteté en comparant ces quelques valeurs à celles du tableau XXII. Il semble donc, que dans le cas de rachitisme, le cartilage de conjugaison, ait une aptitude réduite à fixer les ions $\text{PO}_4^=$ et Ca^{++} lui permettant de s'ossifier, ce qui va de pair avec la production de la dystrophie osseuse. Evidemment cette conclusion mérite d'être confirmée et il y a lieu de compléter ces recherches par

d'autres sur l'aptitude des os rachitiques à fixer non seulement les ions $\text{PO}_4^=$ et Ca^{++} , mais les diverses combinaisons calciques des humeurs. C'est ainsi que par exemple BENJAMIN a pu déjà faire des expériences tendant à montrer que les combinaisons phosphocalciques du sérum adsorbables sur le sulfate de baryum et normalement fixées par l'os quand on le met au contact de celui-ci, ne seraient pas fixées, *in vitro* par l'os rachitique. Mais de toute manière ce premier résultat attire l'attention sur un facteur purement osseux du rachitisme jusqu'ici délaissé par les biochimistes. Certes le mécanisme de la réduction de l'affinité de l'os pour les ions $\text{PO}_4^=$ et Ca^{++} nous échappe, tout autant d'ailleurs que la nature même de cette affinité, mais il n'en demeure pas moins qu'elle doit être mise en cause pour essayer d'expliquer le défaut de calcification des os chez les rachitiques.

DISCUSSION GÉNÉRALE DES RÉSULTATS ET CONCLUSIONS.

Dans l'ignorance où nous nous trouvons encore du mécanisme producteur des lésions osseuses au cours du rachitisme tant pathologique qu'expérimental, il est difficile d'extrapoler les observations de l'un à l'autre. On peut néanmoins essayer de les rattacher à des faits antérieurement établis afin d'en dégager la signification.

Il nous paraît certain que les lésions osseuses du type rachitique ne sont en aucun cas dues à une inhibition du mécanisme osseux de ravitaillement en ions phosphoriques mettant en jeu la phosphatase. En effet, de même que POLICARD, PÉHU, ROCHE et BOUCAUMONT [71] l'ont constaté dans les os d'enfants rachitiques, le cartilage de conjugaison et la métaphyse des os longs de Rats présentant des lésions rachitiques expérimentales sont riches en phosphatase. Dans l'un et l'autre cas, la teneur en enzyme des os est supérieure à celle des pièces squelettiques normales. C'est là d'ailleurs un fait paraissant traduire une sorte de réaction de celles-ci contre le défaut de minéralisation dû à l'ostéolyse, car on le trouve également dans les extrémités des os fracturés à la période où celles-ci se déminéralisent (ROCHE et FILIPPI [88]). Cette augmentation de l'activité phosphatasique des os rachitiques est un témoin chimique de la participation des pièces squelettiques au mécanisme producteur de lésions. Elles permettent d'affirmer que ce dernier n'est pas uniquement intestinal ; car s'il en était ainsi la calcification de l'os ne serait troublée qu'en raison d'un apport sanguin insuffisant en ions PO_4^- et Ca^{++} .

C'est là également la conclusion découlant de notre seconde série d'expériences, bien que ses résultats ne portent, pour des raisons indiquées plus haut, que sur un nombre très restreint d'animaux. Il nous paraît certain que l'affinité du car-

tilage de conjugaison et de l'os métaphysaire pour les ions $\text{PO}_4^{=}$ et Ca^{++} très élevée chez les animaux normaux, est minime chez des animaux soumis à un régime rachitigène. Or c'est justement à la facilité exceptionnelle avec laquelle les os normaux fixent les ions qu'est due leur rapide ossification pendant la croissance. Les travaux de LOGAN et TAYLOR [45] montrent que c'est probablement à l'état d'ions PO_4^- et Ca^{++} que le phosphore et le calcium sont primitivement fixés dans l'os, et, de ce fait, la théorie de ROBISON [75] rapportant à la formation initiale de phosphate tricalcique la calcification de la substance préosseuse semble difficile à admettre comme l'explication unique du mécanisme minéralisateur des os. Aussi comprend-on dès lors que les lésions rachitiques de ceux-ci apparaissent si la zone où l'ostéogénèse est normalement la plus intense perd en partie son aptitude à fixer les éléments du « sel de l'os ».

Le rachitisme expérimental, tel qu'on le provoque au moyen d'ingestion par des animaux en croissance d'un régime déséquilibré en sels dont le rapport : Ca/P , est supérieur à 3, comporte donc à la fois un facteur digestif et un facteur osseux. Le premier se traduit par un défaut de résorption des sels alimentaires, défaut ayant pour conséquence une réduction d'apport en éléments minéraux à l'os. Quant au second, les modalités de sa mise en jeu, sans doute fort complexe, demeurent obscures, mais son existence même ressort des faits que nous avons établis. Cette dualité dans le mécanisme de production des lésions osseuses rachitiques a été également mise en évidence par ailleurs, au cours de travaux sur l'action de la vitamine D et de la carence de celle-ci. NICOLAYSEN et JENSEN [67] ont poursuivi à ce sujet d'intéressantes recherches. Etudiant histologiquement et chimiquement les os des Rats en croissance soumis à un régime rachitigène ils concluent : « Dans des séries d'expériences où la carence en vitamine D a été réalisée au cours de périodes plus ou moins longues la densité de la calcification osseuse paraît être régie uniquement par les quantités de phosphore ou de calcium apportées par le sang. Toutefois, les examens histologiques des os indiquent que la vitamine D peut dans une certaine mesure exercer une influence sur l'architecture des os ». Plus récemment J. ROCHE et MARCELET [92] étudiant l'action de la vitamine D sur des animaux en croissance recevant des régimes déséquilibrés

en sels ont adopté une conclusion du même ordre, à savoir que l'action de la vitamine D s'exerce probablement à la fois sur la résorption du calcium et du phosphore alimentaires (action intestinale) et sur les processus d'ostéogénèse (action osseuse), peut-être par l'intermédiaire de facteurs hormonaux.

Ainsi divers faits relatifs au développement normal du squelette, à l'action de la vitamine D, au mode d'organisation des lésions de type rachitique, suggèrent identiquement la conclusion suivante : *l'existence de troubles dans le ravitaillement de l'os en phosphore et en calcium d'origine digestive ne suffit pas pour expliquer les dystrophies osseuses rachitiques. Celles-ci ne peuvent s'organiser que grâce à des troubles dans la formation et dans la nature du support protéique de la substance osseuse.* Il ne nous appartient pas de discuter le mécanisme de la genèse de ce stroma protéique et, d'ailleurs, nos connaissances à cet égard sont des plus réduites ; mais c'est à notre avis l'étude de ce constituant osseux qui permettra seule de faire des progrès importants dans la connaissance du mécanisme de l'ostéogénèse normale ou pathologique. Notre travail n'est qu'un modeste début de cette étude.

Ces faits orientent donc l'attention sur la matrice protéique de l'os et ils font ressortir à nouveau la nécessité d'acquérir à son sujet des connaissances nouvelles pour pénétrer le mécanisme de la formation de la substance osseuse. Comme l'ont écrit POLICARD et ROCHE [72] « La nature de la substance préosseuse calcaïfrique reste entièrement à déterminer. Le problème sera difficile à résoudre, mais il est capital et mérite de tenter les efforts des biochimistes. Tant qu'il n'aura pas été abordé, nos connaissances sur la formation de la substance osseuse demeureront rudimentaires ». Or des données précises sur le même sujet sont aussi le fondement nécessaire de toute l'interprétation des faits pathologiques et expérimentaux sur l'organisation des dystrophies osseuses. Il faut souhaiter que les travaux qui les apporteront soient poursuivis dans un avenir prochain.

RÉSUMÉ.

1° *L'activité phosphatasique des os de Rats soumis à un régime rachitigène par excès de calcium ($\text{Ca/P} = 3$) est notablement supérieure à celle d'animaux normaux témoins pendant les périodes où les lésions osseuses se constituent. Elle devient par la suite progressivement voisine de celle des os d'animaux témoins quand le rachitisme « guérit » spontanément.*

2° *Les os (métaphyse et cartilage de conjugaison) d'animaux normaux en croissance placés dans une solution saline isotonique ne contenant pas d'ions $\text{PO}_4^{\equiv}$ et Ca^{++} perdent ces derniers en quantité beaucoup plus considérable que les premiers dont le passage en solution est pratiquement nul dans les conditions où nous nous sommes placés. Lorsque le milieu contient ces deux ions, l'os les fixe en proportion assez variable, ne semblant pas correspondre à la formation d'une combinaison chimique définie, mais à la fixation spécifique de chacun.*

3° *L'affinité du cartilage de conjugaison et de la métaphyse des os d'animaux rendus expérimentalement rachitiques pour les ions $\text{PO}_4^{\equiv}$ et Ca^{++} est notablement inférieure à celle des os d'animaux normaux témoins.*

4° *Les lésions rachitiques osseuses ne sont pas dues à un défaut du mécanisme phosphatasique de l'ossification, mais elles vont de pair avec une modification profonde des propriétés de la matrice protéique de l'os, puisque celle-ci présente un abaissement de son aptitude à fixer les ions $\text{PO}_4^{\equiv}$ et Ca^{++} .*

5° *Le rachitisme expérimental, et probablement aussi le rachitisme pathologique, ne saurait avoir pour cause unique un*

*trouble de la résorption digestive du phosphore et du calcium.
Le mécanisme de sa production comprend en outre un facteur
osseux, dont la mise en jeu est nécessairement d'origine endo-
gène, probablement hormonale.*

Marseille le 30 novembre 1940.

Vu et approuvé :

Le Président,

JEAN ROCHE.

Marseille, le 2 décembre 1940.

Vu et approuvé :

Le Doyen,

L. CORNIL.

Aix-en-Provence, le 6 décembre 1940.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur,

E. GAÜ.

BIBLIOGRAPHIE.

1. BAKWIN (H.) and BODANSKY (O.). — Factors influencing the measurement of the phosphatase activity of tissue extracts. *J. of biol. Chem.*, 1933, **101**, 641-656.
2. BELFANTI (S.), CONTARDI (A.) and ERCOLI (A.). — Studies on the phosphatases. The influence of some électrolytes on the phosphatases of animal tissues. Phosphatases of the liver, kidney, serum and bones of the rabbit. *Biochem. J.*, 1935, **29**, 517-527.
3. BELFANTI (S.), CONTARDI (A.) and ERCOLI (A.). — Researches on the phosphatases. II. Inactivation and reactivation of the phosphatase of animal organs. *Biochem. J.*, 1935, **29**, 842-846.
4. BELFANTI (S.), CONTARDI (A.) and ERCOLI (A.). — Researches on the phosphatases. III. On the mechanism of inactivating action of sodium oxalate and of phosphates on the « alkaline » phosphatases of animal tissues. *Biochem. J.*, 1935, **29**, 1491-1507.
5. BESSEY (O. A.), KING (J. G.), QUEEN (T. J.), and SHERMANN (H.C.). — The normal distribution of calcium between the skeleton and soft tissues. *Journ. of biol. chem.*, 1935, **111**, 115-118.
6. BILLS (E. C.) and WIRICK (A. M.). — Long time feeding experiments with activated ergosterol. *J. of biol. chem.*, 1930, **86**, 117-128.
7. BLUM (L.), DELAVILLE (M.) et van CAULAERT (C.). — Sur la pathogénie du rachitisme. Rapport entre les phénomènes d'ossification et de décalcification et l'état physico-chimique du sang. *C. R. Soc. Biol.*, 1925, **92**, 184.
8. BODANSKY (O.). — The accelerant effect of α aminoacids on the activity of bone phosphatase. *J. biol. Chem.*, 1936, **114**, 273-288.
9. BOGERT (L. G.) et HASTINGS (A. B.). — The calcium salts of bone. *J. of biol. chem.*, 1931-1932, **94**, 473-481.
10. BOUCAUMONT (J.). — Recherches histophysiologiques sur le rachitisme dans la première enfance. *Thèse Doct. méd.*, Lyon 1932, 1 vol. 122 p., Bosc et Riou édit., Lyon.
11. BROOKE (R.), SMITH (A.) and SMITH (P.). — Inorganic salts in nutrition. *J. of biol. chem.*, 1934, **104**, 141-148.
12. BRUCE (H. M.) and CALLOW (R. K.). — Interaction of vitamin D and dietary factors in the healing of rickets in rats. *Biochem. J.*, 1934, **28**, 512-516.

13. CATTANEO (G.), GABBRIELLI (M. C.) e SCOZ (G.). — Fofatasi alcalina e attivazione in presenza di sali di magnesio. Relazione tra concentrazione dell' enzima, attività fosfatasica e tempo. *Boll. soc. ital. biol. sper.*, 1937, **12**, 37.
14. CHABRE (P.) — Les huiles de foie de morue. Leur teneur en vitamine A et D. *Thèse Doct. Pharm.*, Marseille, 1936, 1 vol., Masson et Cie édit., 207 p.
15. CHOSSAT. — Note sur le système osseux. *C. R. Acad. Sc.*, 1842, **14**, 451.
16. COHN (W. E.) and GREENBERG (D. M.). — Studies in mineral metabolism with the aid of radioactives isotopes. III. The influence of vitamine D on the phosphorus metabolism of rachitic rats. *J. of biol. chem.*, 1939, **130**, 625-634.
17. DAY (H. G.) and Mac COLLUM (E. V.). — Mineral metabolism, growth and symptomatology of rats on a diet extremely poor in phosphorus. *J. of biol. chem.*, 1939, **131**, 269-284.
18. EDEL (V.). — Recherches chimiques et thérapeutiques sur le rachitisme. *Thèse Med.*, Lyon, 1939, 61 p., Bosc et Riou édit., Lyon.
19. ERDTMAN (H.). — *Zeitsch. physiol. Chem.*, 1928, **177**, 211. Cité par ORENT et KRUSC et Mac COLLUM. Studies on magnesium deficiency in animal. *The Journ. of biol. chem.*, 1934, **106**, 573-593.
20. FELL (H. B.) and ROBISON (R.). — The development of the calcifying mechanism in avian cartilage and osteoid tissue. *Biochem. J.*, 1934, **28**, 2243-2253.
21. FELL (H. B.) and ROBISON (R.). — The development and phosphatases activity *in vitro* of the mandibular skeletal tissue of the embryonic fowl. *Biochem. J.*, 1930, **24**, 1905-1921.
22. FELL (H. B.) and ROBISON (R.). — Th growth development and phosphatases activity of embryonic avian femora and limb-buds cultivated *in vitro*. *Biochem. J.*, 1929, **23**, 767-784.
23. FILIPPI (A.). — Recherches sur la participation d'une phosphatase à la calcification des os longs et à la réparation de leurs fractures. *Thèse Doct. Pharm.*, Marseille 1938, Patissier, édit., Trévoux, 114 p.
24. FLORENTIN (P.). — Le problème de l'ostéogénèse normale. *Biol. Med.*, 1935, **25**, 321-349.
25. FOLLEY (S. J.) and KAY (H. D.). — The phosphatases. *Ergebn. d. Enzymforsch.*, 1936, **5**, 1 vol. 378 p. Akad. Verlagsges M.B.H. édit., Leipzig, pp. 159-212 (Revue d'ensemble).
26. FREUDENBERG et GYORGY cité par SCHOEN (J.). — Les fixateurs du calcium chez l'enfant. *Thèse Doct. Méd.*, Lyon, 1927, 1 vol., Bosc et Riou édit., 187 p.
27. GARCIA (I.). — Recherches sur l'ossification. *Thèse Doct. ès Sciences nat.*, Montpellier, 1 vol., Patissier édit., 1935, 248 p.
28. GARCIA (I.). — Essai d'étude chimique du rapport : squelette masse active de l'organisme, au cours de la croissance et de diverses carences. *Thèse Doct. Pharm.*, Marseille 1935, 1 vol. Sémaphore édit., Marseille, 128 p.

29. GABRIEL (G.) *Ztsch. f. physiol., chem*, 1894, **18**, 257, cité par POLICARD (A.) et ROCHE (J.) dans la formation de la substance osseuse. Essai de coordination des données histologiques et biochimiques. *Extr. Ann. Physiol. et Physicochim. biol.*, 1937, **13**, 645-703.
30. GASSMANN cité par KAY (H. D.). -- In the chemistry and metabolism of the compounds of phosphorus in animals. *Ann. Review of Biochemistry*, 1 vol., 190 p., Standford University Press, 1934.
31. GOLDBLATT (H.). — A study of the relation of the quantity of fat soluble organic factor in the diet to the degree of calcification, of the bones and the development of experimental rickets in rats. *Biochem. J.*, 1923, **17**, N° 2.
32. GRIDGEMANN (N. T.), LEES (H.) and WILKINSON (H.). — The biological essays of low potency materials with special reference to the role of the mineral content of the diet. *Biochem. J.*, 1939, **33**, 645-654.
33. HARRISSON (D. C.) and MELLANBY (S.). — Phytic acid and the rickets producing action of cereals. *J. of biol. chem.*, 1939, **33**, 1660-1680.
34. HARISS (L. J.). -- Vitamins, in. *Ann. Rev. Biochem.*, 1933, **11**, 253-298.
35. HESS (A.). — Rickets including osteomalacia and tetany, 1 vol. 485 p., H. Kimpton édit., London, 1930.
36. HOLT (L.), LA MER (V.) and CHOWN (B.). — Delayed equilibrium between the calcium phosphates and its biological significance. *J. of biol. chem.*, 1925, **64**, 569-578.
37. HOLT (L.), LA MER (V.) and CHOWN (B.). — Studies on calcification. I. The solubility product of secondary and tertiary calcium phosphate under various conditions. *J. of biol. chem.*, 1925, **64**, 509-564.
38. HOPPE-SEYLER (F.) cité par BLANCHETIÈRE (A.). — in Les principes immédiats d'êtres vivants. IV. Les constituants minéraux. *Traité de physiologie* (Roger et Binet), 1932, **1**, 774-779, Masson et Cie édit.
39. HOWLAND (J.) and KRAMER (B.). — Factors concerned in the calcification of bones. *Trans. Amer. Ped. Soc.*, 1922, 134-204.
40. HULDSCHINSKY, HESS et STEENBOCK cités par LEHNARTZ (E.).
41. JENNER (H. D.) and KAY (H. D.). — The phosphatases of mammalian tissues. III. Magnesium and the phosphatases system. *J. of biol. Chem.*, 1931, **93**, 733-748.
42. KLEMENT cité par KAY (H. D.), [30].
43. KORENCHEVSKY (V.). — Experimental rickets in rats. *Brit. Med. Journ.*, 1921, 547. Cité par LABBÉ et FABRYKANT.
44. LANDFORD (C. S.) and SHERMANN (H. C.). — Further studies, of the calcium content of the body as influenced by that of the food, *J. of biol. chem.*, 1938, **126**, 381-388.
45. LOGAN (M. A.) and TAYLOR (H. L.). — Solubility of bone salt. II. Factors affecting its formation. III. Partial solution of bone and carbonate containing calcium. phosphate precipitate. IV. Solubility of bone in biological fluids. *J. of biol. chem.*, 1937, **119**, 293-307. — *Ibid*, 1938, **125**, 377-397. *Ibid*, 1939, **127**, 705-710.

46. LOGAN (M. A.). — Composition of cartilage, bone, dentin and enamel. *J. of biol. Chem.*, 1935, **110**, 375-389.
47. LOGAN (M. A.) and KANE (L. W.). — Solubility of bone salt. IV. Solubility of bone in biological fluids. *J. of biol. chem.*, 1939, **127**, 705-710.
48. MAREK (J.), WELMANN (O.) und URBANY (L.). — Chemischer Aufbau der Knochensalze bei gesunden und bei rachitischen Tieren. *Ztsch. physiol. Chem.*, 1934, **226**, 3-17.
49. Mac CANN (G.) and BARNETT (M.). — Experimental rickets in rats. IX. The distribution of phosphorus and calcium between the skeleton and soft parts of rats on rachitic and non rachitic diets. *J. of biol. chem.*, 1922, **54**, 203-211.
50. Mac CLURE (F. J.) and MITCHELL (H.). — The effect of fluorine on the calcium metabolism of albinos rats and the composition of the bones. *J. of biol. chem.*, 1931, **90**, 297-320.
51. Mac FARLANE (M. G.) PATTERSON (L. B. M.) and ROBISON (R.). — The phosphatase activity of animal tissues. *Biochem. J.*, 1934, **28**, 720-724.
52. MARCELET (Y.). — Unité physiologique du système osseux et mode d'action de la Vitamine D. *Thèse Doct. en Pharm.*, Marseille, 1940, 1 vol., 118 p., Declume édit., Lons-le-Saunier.
53. MARTLAND (M.) and ROBISON (R.). — Possible signifiante of hexose-phosphoric esters in ossification. VI. Phosphorie esters in blood plasma. *Biochem. J.*, 1926, **20**, 847-855.
54. MARTLAND (M.) and ROBISON (R.). — The preparation and use of the bone phosphatase. *Biochem. J.*, 1926, **20**, 847-855.
55. MARTLAND (M.) and ROBISON (R.). — The possible signifiante of hexosephosphoric esters in ossification. *Biochem. J.*, 1927, **21**, 665-674.
56. MELLANBY. — Cité par LEHNARTZ (E.).
57. MORGAN (A. F.). — The effect acid neutral, and basic diets on the calcium and phosphorus metabolism, of dogs. *University of California publ. in physiol.*, 1934, **8**, 61-106.
58. MOURGUE (M.). — Recherches biochimiques sur les fractures osseuses expérimentales. *Thèse Doct. Pharm.*, Marseille, 1939, 117 p., Declume édit., Lons-le-Saunier.
59. MOURIQUAND (G.), LEULIER (A.) et CŒUR (A.). — Recherches sur la pathogénie du rachitisme. (Modification du cycle du cholestérol du phosphore du potassium, de la masse splénique et rôle des antifixateurs et fixateurs du calcium dans le rachitisme expérimental). *Ann. Med.*, 1938, **43**, 165-186.
60. MOURIQUAND (G.), LEULIER (A.). — Le métabolisme et les fixateurs du calcium chez l'enfant. *Congrès de Med. de Liège*. 1930, **36**, 91 p. *
61. MOURIQUAND (G.), LEULIER (A.) et ROCHE (A.). — Magnésium et rachitisme expérimental. *C. R. Soc. Biol.*, 1931, **107**, 676.
62. MORGULIS (S.). — Studies on the chemical composition of bon ash. *J. of biol. chem.*, 1931, **93**, 455-466.
63. NICOLAYSEN (R.). — Untersuchungen über die Kalkausscheidung bei Hunden. *Skand Arch. f. physiol.*, **69**, supp. 66 p., 1934.

64. NICOLAYSEN (R.). — Studies upon the mode of action of vitamin D. III. The influence of vitamins D on the absorption of calcium and phosphorus in the rat. *Biochem. J.*, 1937, **31**, 122-129.
65. NICOLAYSEN (R.). — Studies upon the mode of action vitamin D. IV. The absorption of calcium chloride, xylose, and sodium sulphate from isolated loops of the small intestine and of calcium chloride from the abdominal cavity of the rat. *Biochem. J.*, 1937, **31**, 323-328.
66. NICOLAYSEN (R.). — Studies upon mode of action of vitamin D. V. The absorption of phosphates from isolated loops of the small intestine in the rat. *Biochem. J.*, 1937, **31**, 1086-1088.
67. NICOLAYSEN (R.) and JANSEN. — Vitamin D and bone formation in the rat. *Acta paediatrica*, 1939, **23**, 405-433.
68. NIVEN (J. F. S.) and ROBISON (R.). — The development of the calcifying mechanism in the long bones of the rabbit. *Biochem. J.*, 1934, **28**, 2237-2242.
69. PAGE (I. H.). — Wirkung der Nebenschilddrüsenhormons auf Phosphatase. *Biochem. Ztschr.*, 1930, **223**, 222-227.
70. POLICARD (A.) et LERICHE (R.). — Position actuelle du problème de l'ostéogénèse. *Press. Med.*, 1930, N° 21 du 12 mars 1930.
71. POLICARD (A.), PÉHU (M.), ROCHE (J.) et BOUCAUMONT. — Répartition histologique de la phosphatase dans la zone d'ossification des os longs chez l'enfant normal et rachitique. *Bull. Histol. appl.*, 1931, **8**, 171-175.
72. POLICARD (A.) et ROCHE (J.). — La formation de la substance osseuse. *Ext. Ann. physiol. et physicochim. biol.*, 1937, **13**, 645-703.
73. POLICARD (A.) cité par ROCHE (J.) [84].
74. RANDOIN (L.) et LECOCQ (R.). — Constitution d'un nouveau régime artificiel pour l'étude du rachitisme expérimental. *C. R. Soc. biol.*, 1927, **97**, 1277-1280.
75. ROBISON (R.). — The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification. *Biochem. J.*, 1923, **17**, 286-293.
76. ROBISON (R.). — The significance of phosphoric esters in metabolism, 1 vol., 104 p., New-York Univ. Press edit., 1932.
77. ROBISON (R.). — Bone phosphatase. *Ergbn. d. Enzymforsch.*, 1932, **1**, 1 vol., 375 p. Akad Verlagsges M.B.H. edit., Leipzig, 1932, pp. 280-294.
78. ROBISON (R.) and ROSENHEIM (H. A.). — Calcification of hypertrophic cartilage *in vitro*. *Biochem. J.*, 1934, **28**, 684-698.
79. ROBISON (R.) and SIVIN (H. A.). — The development of calcifying mechanism in the long bones of the rabbit. *Biochem. J.*, 1934, **28**, 2237-2242.
80. ROCHE (A.). — Etude du bilan phosphoré chez le rat soumis à un régime rachitigène riche en calcium, magnésium ou en strontium. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1932, **14**, 634-642.
81. ROCHE (A.) et GARCIA (I.). — Recherches sur l'ossification. I. Ossification normale et constitution de réserves minérales dans les os au cours du développement, *Bull. Soc. chim. biol.*, 1936, **18**, 1014-1026.

82. ROCHE (A.) et GARCIA (I.). — Recherches sur l'ossification. II. Dystrophies osseuses chez le rat en croissance. *Bull. soc. chim. biol.*, 1936, **18**, 1027-1040.
83. ROCHE (A.), ROCHE (J.) et MARCELET (Y.). — Recherches sur l'ossification. IV. Ossification des os plats, étapes du développement du squelette et biochimie générale du système osseux. *Bull. soc. chim. biol.*, 1938, **20**, 705-717.
84. ROCHE (J.). — Quelques problèmes biochimiques posés par l'ossification in : *Exposés annuels de Biochimie médicale*. volume II, 1 vol., Masson et Cie édit., Paris. 1939, 262 p. pp. 237-262.
85. ROCHE (J.). — Blood phosphatases. *Biochem. J.*, 1931, **25**, 1724-1733.
86. ROCHE (J.). — Quelques aspects biochimiques de l'ossification. *Ann. et Bull. soc. Roy. sc. med. et nat. Bruxelles*, 1937, N° 3 et 4, 23-47.
87. ROCHE (J.) et BULLINGER (E.). — Sur le système phosphatasique des hématies. *C. R. soc. Biol.*, 1938, **127**, 1271.
88. ROCHE (J.) et FILIPPI (A.). — Augmentation de l'activité phosphatasique du squelette après fracture d'un os et biochimie générale du système osseux. *Bull. soc. chim. biol.*, 1938, **20**, 1147-1165.
89. ROCHE (J.), FILIPPI (A.) et LÉANDRI (A.). — Recherches sur l'ossification. *Bull. soc. Chim. biol.*, 1937, **19**, 1314-1324.
90. ROCHE (J.) et LATREILLE (M.). — Sur la spécificité des phospho-estérases. Contribution à l'étude des phosphomonoestérases du foie et du rein. *Enzymologia*, 1937, **3**, 75-81.
91. ROCHE (J.) et LÉANDRI (A.). — Etude quantitative de la phosphatase des os longs au cours de la croissance du rat. *C. R. soc. biol.*, 1935, **119**, 1141.
92. ROCHE (J.) et MARCELET (Y.). — Nature du régime et action de la Vitamine D chez l'animal en croissance et chez l'adulte. Comm. Congrès Médecine Marseille, 1938, 1 vol., Masson et Cie édit., Paris, pp.
93. ROMINGER (S.). — Physiologie and pathologie des D Vitamins *Ergb. d. Hormon und Vitamin Forsch.*, 1939, **2**, 104-109. 1 vol. Akad Verlag édit., M.B.H. Leipzig, p.
94. RONA (P.) et TAKAHASHI (D.). — Beitrag zur Frage nach dem Verhalten des Calciums im Sérums. *Bioch. Ztsch.*, 1913, **49**, 370-382.
95. ROSEBERY (H.), HASTINGS (A.) and MORSE (J. K.). — X-Ray analysis of bone and teeth. *J. of biol. chem.*, 1931, **90**, 395-406.
96. ROTTENSTEEN (B.). — The effect of body stores on the efficiency of calcium utilisation. *Biochem. J.*, 1938, **32**, 1285-1292.
97. SCHNEIDER (H.) and STEENBOCK (H.). — A low phosphorus diet and the response of rats to vitamin D. *J. of biol. chem.*, 1939, **128**, 159-171.
98. SCHÖEN (J.). — Les fixateurs du calcium chez l'enfant. Etude clinique et expérimentale. *Thèse Doct. Méd.*, Lyon, 1927, 1 vol., 180 p., Bosc et Riou édit., Lyon.
99. SCHULTZER (P.). — Le phosphore et le calcium minéral de rats rachitiques sous l'influence des différents traitements. *C. R. Soc. biol.*, 1925, **81**, 1002-1010.

100. SCOZ (G.) e MARANGONI (P. L.). — Variazioni del potere fosfatasico del sangue e dell'osso e del processo di ossificazione in rapporto con la velocita di accrescimento normale e sperimentalmente modificata. *Arch. di sc. biol.*, 1936, **22**, 43-65.
 101. SHEAR (M. J.) and KRAMER (B.). — Composition of bone. I. Analytical micromethod. *J. of biol. chem.*, 1928, **79**, 105-120.
 102. SHEAR (M. J.) and KRAMER (B.). — Composition of bone. Physico-chemical mechanism. *J. of biol. chem.*, 1928, **79**, 125-143.
 103. SHERMANN (H.) and PAPPENHEIMER (A.). — A dietetic production of rickets in rats and its prevention by an inorganic salt. *Proc. soc. Exp. biol. Med.*, 1921, **18**, 193.
 104. SHIPLEY (P.), PARK (E.), Mac COLLUM (E.) and SIMMONDS (N.). — Studies in experimental rickets. III A pathological condition bearing fundamental resemblances to rickets of the human being resulting from diets low in phosphorus and fat soluble. A. The phosphate ion in its prevention. *John Hopk. Hosp. Bull.*, 1921, **32**, 160.
 105. SHIPLEY (P. G.), KRAMER (B.) and HOWLAND (J.). — Studies upon calcification *in vitro*. *Biochem. J.*, 1926, **20**, 379-387.
 106. SHOLL (A. T.), BENNETT (H. B.) and WELD (K. L.). — Rickets in rats, comparison of effects of irradiated ergosterol and cod liver oil *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1928, **25**, 551.
 107. TANNHAUSER (S. J.), REICHEL (M.) and GRATTAN (J. F.). — Studies on serum phosphatase activity. I. Ascorbic acid activation on serum phosphatase *J. biol. chem.*, 1937, **121**, 697-708.
 108. TANNHAUSER (S. J.), REICHEL (M.), GRATTAN (J. F.) and MADDOCK (S. J.). — Studies on serum phosphatase activity. V. Studies concerning increased serum phosphatases values in disease. *J. biol. chem.*, 1937, **121**, 727-736.
-

IMPRIMERIE M. DECLUME
LONS-LE-SAUNIER.

